

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS**



**ENDOMETRITIS SUBCLINICA EN LA PERRA**

**Trabajo de Tesis realizado para optar por el título**

**de Doctor en Ciencias Veterinarias**

Autor: MV., Praderio Romina Gisele

Director: MV., Dr. Cs. Vet. Stornelli María Alejandra

Codirector: MV., Dr. Cs. Vet. García Mitacek María Carla

Lugar de Trabajo: Laboratorio y Servicio de Reproducción Animal,  
Facultad de Ciencias Veterinarias,  
Universidad Nacional de La Plata

Miembros del Jurado: MV., MSc, PhD. Marcelo Miragaya  
MV., Dra. Cs. Vet. Magdalena Wanke  
MV., Dra. Cs. Vet. Viviana De Palma

La Plata, 21 de marzo de 2019

## **Dedicatoria**

Con mucho cariño a mis padres y abuelos, a mi hermano, a Ana y a Irma, quienes me apoyan y acompañan en todo desde que tengo mis primeros recuerdos. Todos mis logros son en gran parte sus logros.

A Seba, quien ilumina mis días desde que llegó a mi vida.

### **Agradecimientos**

Quiero agradecerle muy especialmente a mi directora de tesis, la Dra. María Alejandra Stornelli, a quien admiro mucho, tanto en lo profesional como en lo personal, por abrirme las puertas de la Cátedra, por confiar en mí, por apoyarme, incentivarme y brindarme cada día y muy de cerca todos sus conocimientos. Por haber estado siempre cuando la necesité.

A mi codirectora, la Dra. María Carla García Mitacek, con quien compartí mucho todos estos años desde mi primer día como becaria alumna, quiero agradecerle enormemente por sus correcciones y aportes, por ayudarme y alentarme, y por ser un sostén muy importante en el último tiempo.

Al Dr. Luzbel de la Sota por sus correcciones y aportes desinteresados a esta tesis, por brindarme sus conocimientos, por su amabilidad y respeto.

A la UNLP por ser el establecimiento que permitió realizar mis estudios de grado y posgrado. Le estoy enormemente agradecida por brindar educación pública, gratuita y de calidad.

A la CIC por haberme otorgado mi primer beca de iniciación a la investigación.

Al CONICET por haberme otorgado la beca para poder realizar esta tesis doctoral.

A los jurados por sus aportes y correcciones.

A las “pequeñólogas”, la MV. Florencia García, la Dra. Romina Nuñez Favre, la Dra. María Candela Bonaure y la Dra. María Cecilia Stornelli, por ser parte de este grupo de trabajo, por su apoyo, y por todos los momentos lindos que compartimos en tantos años.

A mi becaria alumna, la MV. Florencia Coralli, por su participación en este trabajo, por sus ganas de aprender y su buena predisposición.

A mis compañeras de todos los días, la Dra. Vanina Madoz, la Dra. Claudia Titarelli, la MV. Miriam Azcurra y la MV. Maricel Compagnoni, con quienes formamos un hermoso grupo de trabajo, quiero agradecerles por su compañía, aliento, apoyo, empatía, y por las risas y los mates de cada día. Gracias por apoyarme tanto en las buenas y en las malas.

A la Dra. María Jaureguiberry con la cual realicé la mayoría de los cursos, conocí a una gran persona y encontré una amiga.

A la MV. Lorena Migliorisi por estar dispuesta siempre a ayudar, a escuchar y a cebar sus mejores mates.

A todos los integrantes de la Cátedra de Reproducción Animal, quiero agradecerles por su compañerismo y su buena vibra.

A la Cátedra de Patología Especial, y muy especialmente a la Dra. Adriana Massone por enseñarme y ayudarme con la interpretación de los cortes histológicos.

A la Cátedra de Histología y muy especialmente a su técnico Rubén Mario por el procesamiento de las biopsias uterinas.

Al SEDYByA por el procesamiento de las muestras para bacteriología.

Al MV. Ramiro Rearte por su paciencia, compromiso y su gran ayuda en el análisis estadístico.

A todos los integrantes del Centro de Zoonosis de La Plata, por permitirme asistir al centro y coleccionar las muestras necesarias para llevar a cabo mi trabajo de tesis. Y muy especialmente a los Médicos Veterinarios por recibirme siempre con

la mejor onda y por su buena predisposición incluso en los días de mucho trabajo. Sin ustedes esta tesis no podría haberse realizado.

Al MV. Roberto Acosta por participar en este trabajo de tesis durante los primeros años y al Dr. Patricio García por brindarme sus conocimientos y por ayudarme siempre.

A mis amigas y hermanas de la vida, Carla y Daiana por estar siempre en todas y por haber formado este lazo indestructible.

A todos mis amigos por ser un importante y fuerte sostén.

A Gustavo y a Marcelo por ayudarme siempre en todo.

A Nilda, por sus buenas energías, su amabilidad, su cariño y su apoyo desde el primer día que la conocí.

A mis ahijados, Ariadna y Ramiro, y a Francisco, mi sobrino del corazón por ser tres personitas hermosas y llenas de luz.

Enormemente, a Seba.

Y eternamente a mis padres y hermano, a mis queridos abuelos María, Antonio y Sara, y a Irma y Ana, por el apoyo incondicional y ser parte de cada uno de mis días.

## LISTA DE PUBLICACIONES

### TRABAJOS PUBLICADOS EN REVISTAS PERIÓDICAS

1. **Praderio RG**, García Mitacek MC, Stornelli, MC, García F, Stornelli MA. Lesiones histopatológicas más frecuentes en el endometrio de perras clínicamente sanas en diestro. InVet 2018; 20: 1-11.
2. **Praderio RG**, García Mitacek MC, Nuñez Favre R, Stornelli MA. Afecciones uterinas subclínicas como causa potencial de infertilidad o subfertilidad en la perra. Revista cuyana 2018; 11: 25-31.
3. **Praderio RG**, García Mitacek MC, Nuñez Favre R, Rearte R, de la Sota RL, Stornelli MA. Endometrial cytology, biopsy, bacteriology, and serum C-reactive protein for the diagnosis of endometrial disease. Theriogenology. En prensa.

### TRABAJOS PRESENTADOS EN CONGRESOS

1. **Praderio RG**, García Mitacek MC, Stornelli MC, Massone AR, Acosta R, Stornelli MA. Estudio de biopsias endometriales en perras clínicamente sanas. XV Jornadas de Divulgación Técnico Científicas. FCV- UNR, 10 de Septiembre de 2014.
2. **Praderio RG**, García Mitacek MC, Stornelli MC, García MF, Massone AR, Stornelli MA. Estudios citológicos e histopatológicos de endometrio en caninos. XVI Congreso de Ciencias Morfológicas y 13° Jornadas de Educación. FCV-UNLP, 18 y 19 de Septiembre de 2014.

3. **Praderio RG**, García Mitacek MC, Nuñez Favre R, Bonaura MC, Rojas Zamora CA, Stornelli MA. Endometritis subclínica en caninos. Biopsias uterinas en perras clínicamente sanas. II Simposio Latinoamericano de Reproducción Animal, Chile, 13 y 14 de Noviembre 2014.
4. **Praderio RG**, Stornelli MA. Endometritis Subclínica en la perra. Jornada de Ciencia y Técnica de la FCV-UNLP, 28 de Noviembre 2014. *Analecta Veterinaria*. Vol. 34 (1-2): 78. 2014.
5. **Praderio RG**, García Mitacek MC, Bonaura MC, García F, Stornelli MA. Prevalencia y diagnóstico de endometritis subclínica en la perra (*Canis lupus familiaris*). XVI Jornadas de Divulgación Técnico-Científicas. FCV-UNR. Casilda, Santa Fe, 16 de septiembre de 2015.
6. **Praderio RG**, Flamini A, Stornelli MC, Massone AR, de la Sota RL, Stornelli MA. Estudio morfométrico endometrial en perras con y sin endometritis. XVII Congreso de Ciencias Morfológicas y 14° Jornadas de Educación. CONICET-Centro Científico y Tecnológico-CCT La Plata, 10 y 11 de Septiembre de 2015.
7. **Praderio R**, Guerrero A, García Mitacek M, Stornelli MC, Stornelli MA. Estudio bacteriológico endometrial y vaginal en caninos. IX Jornadas Internacionales de Veterinaria Práctica del Colegio de Veterinarios de la Provincia de Buenos Aires. Mar Del Plata, 28 y 29 de Agosto de 2015.
8. **Praderio RG**, García Mitacek MC, Massone AR, Stornelli MC, de La Sota RL, Stornelli MA. Histopathologic and bacteriological findings in uterine biopsy samples and concentrations of C reactive protein as a serum marker in bitches with subclinical endometritis. 8<sup>th</sup> International

symposium for canine and feline reproduction (ISCFR). Francia, junio de 2016. P. 153.

9. **Praderio RG**, Madariaga G, Massone A, García Mitacek MC, Stornelli MC, Stornelli MA. Estudio histológico y morfométrico del endometrio canino (*Canis lupus familiaris*). XVIII Jornadas de Divulgación Técnico-Científicas–V Jornada Latinoamericana. 12 y 13 de septiembre 2017, FCV-UNR, Casilda, Santa Fe.
10. **Praderio RG**, García Mitacek MC, Stornelli MA. Morfometría endometrial en diferentes etapas del diestro canino. XXV Jornadas de jóvenes investigadores de la AUGM. 18, 19 y 20 de octubre de 2017. Encarnación, Paraguay.
11. **Praderio RG**, García Mitacek MC, Stornelli MC, Nuñez Favre R, Stornelli MA. Computerized morphometric analysis of endometrium: a tool for subclinical endometritis diagnosis in the bitch. XXI Congress of the European Veterinary Society for Small Animal Reproduction 2018.
12. **Praderio RG**, García Mitacek MC, Rearte R, Stornelli MC, Stornelli MA. Histomorphometrics studies in normal canine endometrium during dioestrus. XXI Congress of the European Veterinary Society for Small Animal Reproduction 2018.
13. **Praderio RG**, García Mitacek MC, Stornelli MC, Coralli F, Stornelli MA. Determinación de proteína C reactiva en perras con y sin endometritis subclínica. XIX Jornadas de Divulgación Técnico- Científicas 2018 - Facultad de Ciencias Veterinarias- VI Jornada Latinoamericana-IV Jornadas de Ciencia y Tecnología 2018-Facultad de Ciencias Agrarias-III



Reunión transdisciplinaria en Ciencias Agropecuarias 2018-Universidad Nacional de Rosario. Zavalla/Casilda-Santa Fe-Argentina-16 y 17 de agosto de 2018.

14. **Praderio RG**, García Mitacek MC, Stornelli MA. Citología endometrial y biopsia uterina como técnicas diagnósticas para la endometritis subclínica en la perra. XXVI Jornadas de jóvenes investigadores de la AUGM. 17, 18 y 19 de octubre de 2018. Mendoza, Argentina.

#### PARTICIPACIONES EN CAPÍTULO DE LIBROS

1. **Praderio RG**. “Anatomía reproductiva y examen del tracto reproductivo de la hembra canina y felina”. En STORNELLI MA, de la SOTA RL. ed. pp. 23-35. Manual de Reproducción de Animales de Producción y Compañía. Libros de Cátedra de la UNLP. EDULP. Año 2016. ISBN 978-950-34-1381-4
2. **Praderio RG**. “Enfermedades del tracto reproductivo de la hembra canina”. En STORNELLI MA, de la SOTA RL. ed. Manual de Reproducción de Animales de Producción y Compañía. pp. 385-412. Libros de Cátedra de la UNLP. EDULP. Año 2016. ISBN 978-950-34-1381-4.
3. **Praderio RG**. Imágenes de citología endometrial canina en: Capítulo III: Imágenes citológicas e histopatológicas bovinas y caninas. En STORNELLI MA, de la SOTA RL. ed. Atlas de reproducción de animales de producción y compañía. pp. 72. Libros de cátedra de la UNLP EDULP. Primera edición. Año 2017. Autor colaborador. ISBN 978-950-34-1532-0.

4. **Praderio RG.** Imágenes de biopsias endometriales caninas en: Capítulo III: Imágenes citológicas e histopatológicas bovinas y caninas. En STORNELLI MA, de la SOTA RL. ed. Atlas de reproducción de animales de producción y compañía. pp. 73-75. EDULP. Año 2017. Autor colaborador. ISBN 978-950-34-1532-0.

## ÍNDICE

	PÁGINA
DEDICATORIA .....	II
AGRADECIMIENTOS .....	III
LISTA DE PUBLICACIONES .....	VI
LISTA DE ABREVIATURAS.....	XVI
LISTA DE TABLAS .....	XIX
LISTA DE FIGURAS .....	XX
RESUMEN.....	XXIII
SUMMARY .....	XXIV
CAPÍTULOS	
I. INTRODUCCIÓN GENERAL .....	1
II. DETERMINACIÓN DE LA PREVALENCIA DE ENDOMETITIS	
SUBCLÍNICA EN LA PERRA, Y COMPARACIÓN DE LA	
SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DEL DIAGNÓSTICO DE	
ENDOMETRITIS SUBCLÍNICA POR CITOLOGÍA ENDOMETRIAL EN	
COMPARACIÓN CON LA BIOPSIA UTERINA .....	13
Introducción .....	13
Objetivos.....	15

Hipótesis .....	15
Materiales y Métodos .....	15
Diseño experimental.....	15
Procesamiento y toma de muestras .....	16
Biopsia uterina .....	17
Citología vaginal y endometrial.....	17
Medición de progesterona sérica.....	19
Análisis estadístico .....	19
Marco bioético del uso de animales .....	19
Resultados.....	20
Biopsia uterina .....	20
Citología endometrial .....	27
Progesterona sérica.....	29
Discusión .....	30
Conclusión .....	34
 III. DIAGNÓSTICO BACTERIOLÓGICO DE LA ENDOMETRITIS	
SUBCLÍNICA EN LA PERRA.....	36
Introducción.....	36

Objetivos .....	37
Hipótesis.....	37
Materiales y Métodos.....	38
Diseño experimental.....	38
Procesamiento y toma de muestras .....	38
Marco bioético del uso de animales .....	40
Resultados .....	40
Cultivos vaginales .....	40
Cultivos uterinos .....	41
Discusión.....	41
Conclusión.....	44
IV. EVALUACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA C REACTIVA EN PERRAS CON Y SIN ENDOMETRITIS SUBCLÍNICA	
Introducción.....	45
Objetivos .....	47
Hipótesis.....	47
Materiales y Métodos.....	47
Diseño experimental.....	47

Procesamiento y toma de muestras .....	47
Análisis estadístico .....	49
Marco bioético del uso de animales .....	49
Resultados .....	49
Discusión.....	50
Conclusión.....	52
V. MORFOMETRÍA ENDOMETRIAL EN DIFERENTES ETAPAS DEL DIESTRO CANINO	
Introducción.....	53
Experimento I.....	55
Objetivos .....	55
Hipótesis.....	55
Materiales y Métodos.....	55
Diseño experimental.....	55
Toma de muestras .....	56
Experimento II.....	57
Objetivos .....	57
Hipótesis.....	57

Materiales y Métodos.....	58
Diseño experimental.....	58
Toma de muestras .....	58
Experimentos I y II .....	59
Análisis estadístico .....	59
Marco bioético del uso de animales.....	60
Resultados .....	60
Experimento I.....	60
Experimento II .....	62
Discusión.....	64
Conclusiones .....	68
CONCLUSIONES GENERALES.....	69
BIBLIOGRAFÍA .....	70
BIOGRAFÍA .....	78

**LISTA DE ABREVIATURAS**

BGNNF Bacilos gram negativos no fermentadores

BU Biopsia Uterina

CE Citología endometrial

CG Células glandulares

CL Cuerpo lúteo

CLs Cuerpos lúteos

CMM Cuadrados medios mínimos

DTE Diestro temprano

DME Diestro medio

DTA Diestro tardío

ES Endometritis subclínica

ESA Endometritis subclínica aguda

ESSA Endometritis subclínica subaguda

ESC Endometritis subclínica crónica

E<sub>2</sub> Estrógenos

GE Grosor endometrial

H Hora



HE	Hiperplasia endometrial
HEQ	Hiperplasia endometrial quística
IL-6	Interleukina 6
im	Intramuscular
iv	Intravenosa
kg	Kilogramo
L	Litro
LH	Hormona luteinizante
MO	Microscopio óptico
ml	Mililitro
mg	Miligramo
ng	Nanogramos
NOR	Normal
PMNN	Polimorfonucleares neutrófilos
P <sub>4</sub>	Progesterona
PFAs	Proteínas de fase aguda
TNF- $\alpha$	Factor de necrosis tumoral alfa

**LISTA DE TABLAS**

Tabla	Página
2. 1. Etapa del diestro de las perras en el momento de la toma de muestra.....	20
2. 2. Diagnóstico de afecciones endometriales realizado mediante biopsia por diferentes autores.....	34
3. 1. Bacterias aisladas de cultivos vaginales de perras con endometrio normal y perros con endometritis subclínica.....	40
3. 2. Porcentaje de bacterias aisladas de cultivos vaginales. ....	41

## LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1.1. Corte histológico de útero normal de perra en el cual se pueden observar las diferentes capas del endometrio y las estructuras que lo componen. ....	7
1.2. Anatomía de la vagina craneal de la perra. ....	9
1.3. Imagen de cérvix y fondo de vagina de la perra.....	10
1.4. Vista lateral del cérvix y fondo de saco de la vagina canina.....	10
2.1. Procesamiento y toma de muestras.....	17
2.2. Imágenes de elementos para citología endometrial.....	18
2.3. Microfotografías de biopsias uterinas teñidas con H&E, Endometrio normal. ....	22
2.4. Microfotografías de biopsias uterinas teñidas con H&E, hiperplasia endometrial quística.....	22
2.5. Microfotografías de biopsias uterinas teñidas con H&E, endometritis subclínica aguda. ....	23
2.6. Microfotografías de biopsias uterinas teñidas con H&E, endometritis subclínica subaguda. ....	24
2.7. Microfotografías de biopsias uterinas teñidas con H&E, endometritis subclínica crónica. ....	25
2.8. Porcentajes de afecciones uterinas observadas en el estudio histopatológico .....	26
2.9. Porcentajes y tipos de endometritis subclínica observadas en el estudio histopatológico. ....	26
2.10. Microfotografías de citología endometrial.....	28

2.11. Porcentaje de células polimorfonucleares neutrófilos en la citología endometrial de perras con útero normal y perras con endometritis subclínica. ....	28
2.12. Porcentaje de células polimorfonucleares neutrófilos en citología endometrial de perras con útero normal y perras con endometritis subclínica aguda, endometritis subclínica subaguda y endometritis subclínica crónica. ....	29
2.13. Concentraciones de progesterona en perras con útero normal y perras con endometritis subclínica. ....	29
4.1. Procesamiento de las muestras de proteína C reactiva en el laboratorio. ....	49
5.1. Microfotografías de útero canino normal en diestro. ....	57
5.2. Altura de las células glandulares endometriales, grosor endometrial y concentraciones de progesterona en las diferentes etapas del diestro en perras con endometrio normal. ....	61
5.5. Altura de las células glandulares endometriales, grosor endometrial y concentraciones de progesterona en las diferentes etapas del diestro en perras con endometritis subclínica. ....	63
5.8. Altura de las células glandulares endometriales y grosor endometrial en perras con útero normal y perras con endometritis subclínica. ....	64

*“La utopía está en el horizonte.*

*Camino dos pasos, ella se aleja dos pasos  
y el horizonte se corre diez pasos más allá.*

*Entonces, ¿para qué sirve la utopía?*

*Para eso sirve, para caminar”*

***Eduardo Galeano***

**TÍTULO** Endometritis subclínica en la perra.  
**PALABRAS CLAVES** Perra, Endometritis subclínica, Diagnóstico.  
**RESUMEN**

La endometritis subclínica (ES) es una enfermedad uterina reconocida como causa de subfertilidad o infertilidad en la vaca y en la yegua produciendo importantes pérdidas económicas. La ES era considerada como una enfermedad de baja prevalencia y por lo tanto con escaso impacto sobre la eficiencia reproductiva de la perra. En los últimos años, estudios realizados mostraron que la importancia de la ES en la perra podía ser mayor a lo que se creía. En nuestro país, el continuo crecimiento de la cría de perros de raza, con el consiguiente incremento del número de criaderos ha impulsado la expansión de esta actividad. Este hecho ha estimulado el desarrollo y la implementación de metodologías que permitan aumentar la eficiencia reproductiva de criaderos caninos. El objetivo de la presente tesis fue estudiar la prevalencia de ES en la perra e implementar métodos complementarios de diagnóstico que sean útiles en la clínica reproductiva. El plan de trabajo consta de 3 experimentos. En el experimento I se determinó la prevalencia de ES en la perra y se comparó la sensibilidad y especificidad del diagnóstico de ES por citología endometrial (CE) en comparación con la biopsia uterina (BU). En el experimento II se estudió la implicancia bacteriana en la ES. En el experimento III se determinó la concentración sérica de proteína C reactiva en perras con y sin ES. El estudio de BU permitió obtener datos importantes relacionados con la ocurrencia de ES en la perra. Asimismo, se observó un bajo grado de acuerdo entre la BU y la CE para el diagnóstico de ES. Por otra parte, las bacterias parecieran no tener importancia en el desarrollo de ES en la perra, al igual que en la vaca. La proteína C-reactiva pareciera no ser útil para la aproximación diagnóstica de ES en la perra.

**TITLE** Subclinical endometritis in the bitch.  
**KEY WORDS** Bitch, Subclinical endometritis, Diagnosis.  
**SUMMARY**

Subclinical endometritis (SE) is a uterine disease and is recognized as a condition that can lead to subfertility or infertility and economic losses in cows and mares. Subclinical endometritis was considered a disease with low prevalence and therefore with low impact on the reproductive efficiency in the bitch. In the last years, studies have shown that the importance of SE in the bitches could be greater than previously believed. In our country, the sustained growth of kennels with the consequent increase in the number of breeders has transformed this activity. This fact has stimulated the development and implementation of methodologies to increase the reproductive efficiency of kennels. The objectives of this dissertation were to study the prevalence of SE in the bitch and implement additional diagnostic methods that are useful in the reproductive clinic. Three experiments were carried out to accomplish these objectives. In experiment I the prevalence of SE in the bitch was determined and the sensitivity and specificity of the diagnosis of SE by endometrial cytology (EC) compared to uterine biopsy (UB) was compared. In experiment II, the implication of bacteria in SE was studied. In experiment III, the serum concentration of C-reactive protein was determined in bitches with and without SE. The study of the UB allowed obtaining important data associated to the prevalence of SE in the bitch. Likewise, a low degree of agreement was observed between the UB and the EC for the diagnosis of SE. On the other hand, we did not find relevance of bacteria on development of SE in the bitch, as in the cow. The C-reactive protein is not useful for diagnosis of SE in the bitch.

# CAPÍTULO I

## INTRODUCCIÓN GENERAL

Las consultas por problemas de infertilidad o subfertilidad en la hembra canina son frecuentes en la clínica reproductiva diaria y, en variadas ocasiones, no se logra arribar a un diagnóstico definitivo luego de descartar las causas conocidas de infertilidad o subfertilidad. Existen diversas causas de infertilidad o subfertilidad dentro de las cuales podemos citar los problemas asociados al manejo de los animales (fallas en la determinación del momento de mayor fertilidad), administración de anticonceptivos progestágenos durante períodos prolongados y enfermedades infecciosas (*Brucella canis*, *enterococos*, cocos gram positivos y *Mycoplasma* spp). Otras causas, menos frecuentes, pueden ser la oclusión oviductal (congénita o adquirida), quistes foliculares y estro persistente secundario a quistes foliculares (Grundy y col., 2002; Wilborn y Maxwell, 2012). Las afecciones del endometrio alteran la fisiología del medio ambiente uterino lo cual provoca fallas en la implantación, asociándose a infertilidad o subfertilidad, debido a que el útero es el sitio donde ocurre la implantación. Es así que afecciones del endometrio que alteren su fisiología pueden cursar con infertilidad o subfertilidad como única manifestación, sin ocurrencia de otros signos clínicos concomitantes.

En la endometritis, inflamación de la mucosa uterina, puede observarse en el examen histopatológico cambios inflamatorios como infiltración de células inflamatorias, congestión vascular, hiperemia, hemorragia y edema en el estroma



(McEntee, 1983; DeBois y Manspeaker, 1986; Bondurant, 1999). Cuando existe inflamación en el endometrio en ausencia de signos clínicos se la denomina ES (Sheldon y col., 2006; Mariño Fuentes y col., 2017).

En la yegua y en la vaca, la ES ocurre en hembras clínicamente sanas y se asocia a fallas en la concepción. Tanto en bovinos como en equinos, la ES produce grandes pérdidas económicas debido a la disminución de la eficiencia reproductiva, siendo una de las principales causas de infertilidad o subfertilidad, aumentando los intervalos parto-concepción y parto-parto (Bain, 1966; Doig y col., 1981; Kasimanickam y col., 2004; LeBlanc y Causey, 2009; Sheldon y col., 2009; LeBlanc, 2010; Madoz, 2011; Cocchia y col., 2012). En yeguas, durante la época reproductiva, el diagnóstico y tratamiento de esta entidad es esencial para lograr altos porcentajes de preñez dentro del plantel (Overbeck y col., 2011). En dicha especie, la ES es reconocida como la causa más importante de subfertilidad (LeBlanc y Causey, 2009). En la especie bovina, la ES es una enfermedad costosa para los productores lecheros debido a los tratamientos requeridos, a la menor producción de leche, a la menor fertilidad y al incremento de refugos (Risco y Hernández, 2003; Madoz, 2011). Al cursar la ES sin signología clínica a excepción de las fallas en la concepción, su diagnóstico es dificultoso. Los cambios uterinos se localizan en la capa más superficial del útero ocurriendo infiltración de células inflamatorias, cambios degenerativos de las células epiteliales del endometrio e incluso descamación de estas células hacia la luz uterina (McEntee, 1983; De Bois y Manspeaker, 1986). Estos cambios no pueden detectarse mediante estudios complementarios no invasivos como la ultrasonografía (Fontaine y col., 2009). Es así que, en bovinos y equinos se han

estudiado algunos métodos poco invasivos con el fin de diagnosticar de manera fácil y eficaz la ES (Madoz y col., 2011; Overbeck y col., 2013).

La importancia que se había adjudicado a la ES como entidad que afecta la eficiencia reproductiva en la perra hace 17 años, era escasa. La ES era considerada como una entidad de baja incidencia y por lo tanto con escaso impacto sobre la eficiencia reproductiva de la perra, mientras que la HEQ era considerada la afección uterina más frecuente (Dow, 1958; Johnston y col., 2001; Verstegen y col., 2008; Schlafer y col., 2012). Este hecho podría asociarse a que las perras tuvieron un rol preponderante como mascotas en la sociedad y las consultas por problemas de fertilidad eran poco frecuentes en la clínica diaria. Sin embargo, el desarrollo de la cría canina asociado al aumento en la demanda de caninos de raza y, en consecuencia, la expansión de criaderos caninos ha incrementado el porcentaje de consultas por fallas en la concepción en la clínica reproductiva. Como se describió anteriormente, muchas y variadas son las causas de infertilidad en la perra, por lo cual la lista de diagnósticos diferenciales es extensa (Grundy y col., 2002). Sin embargo, en muchas ocasiones, la causa de infertilidad o subfertilidad permanece desconocida. La importancia de la ES en vacas y yeguas y su impacto económico-productivo al afectar la eficiencia reproductiva sugieren que esta enfermedad podría comportarse de igual modo en la especie canina y ser, por lo tanto, una de las causas de fallas en la concepción. En los últimos años, los resultados obtenidos en algunos estudios realizados mostraron que la importancia de la ES en la perra podría ser mayor a lo que se creía. Sin embargo, existen escasos estudios sobre la ocurrencia y prevalencia de ES en caninos (Christensen y col., 2012; Mir y col., 2013; Gifford y col., 2014).

El conocimiento de las características reproductivas de la hembra canina posibilita comprender las variaciones endometriales en relación con el ciclo estral y los aspectos relacionados con las afecciones endometriales. La perra presenta características reproductivas que la distinguen de otras especies. Es monoéstrica con escasa o nula estacionalidad y luego de la ocurrencia del ciclo estral se produce un período de anestro de duración variable (2 a 10 meses; Concannon, 1993). Asimismo, presenta la particularidad de poseer concentraciones de  $P_4$  sérica ya elevadas en momentos previos a la ovulación. Hacia el final de la fase folicular, cuando las concentraciones séricas de  $E_2$  alcanzan sus máximos niveles se desencadena el pico preovulatorio de LH (Concannon y col., 1975; Concannon y col., 1977). Al inicio del pico preovulatorio de LH, las células de la teca folicular comienzan a luteinizarse y a secretar  $P_4$ , la cual se mantiene en ascenso hasta después de la ovulación y formación del CL (Concannon y col., 1977; de Gier y col., 2006). La ovulación sobreviene aproximadamente 48 h después del pico de LH. A diferencia de otras especies, la perra ovula ovocitos primarios, inmaduros, los cuales luego de 48-72 h maduran en el oviducto y son aptos para ser fecundados. Una vez finalizado el estro, comienza el diestro, el cual se caracteriza por altas concentraciones de  $P_4$  sérica provenientes de los CLs posovulatorios. Debido a la ausencia de factores luteolíticos, en la hembra vacía, el CL perdura durante más de dos meses produciendo altas concentraciones de  $P_4$  sérica por más tiempo que lo ocurrido en la hembra preñada (Johnston y col., 2001; Feldman y col., 2007). El diestro puede dividirse en 3 etapas, diestro temprano (DTE), diestro medio (DME) y diestro tardío (DTA). En cada etapa el endometrio está expuesto a diferentes concentraciones de  $P_4$  en relación con la

edad y funcionalidad de los CLs. En la perra, ocurrida la ovulación y posterior fecundación, el embrión, en estadio de cigoto, llega al útero y migra hasta producirse la implantación entre los días 17 y 19 luego del pico de LH (Concannon y col., 2001; Pretzer, 2008). A partir de la implantación comienza el período de embrión propiamente dicho, el cual finaliza el día 35 con la completa organogénesis, la cual da inicio al período fetal. En este último período el feto se mantiene en crecimiento hasta el momento en que se desencadena el parto (Pretzer, 2008). La alteración del medio ambiente uterino se asocia a fallas en la implantación debido a que se alteran las condiciones medioambientales del útero que permiten mantener la gestación (Feldman y Nelson, 2007).

En la perra no preñada las altas concentraciones de  $P_4$  sérica del diestro actúan sobre el endometrio promoviendo el crecimiento y la secreción de las glándulas endometriales y la supresión de la actividad miometrial lo cual lleva a la acumulación de secreción glandular en el útero predisponiendo a afecciones endometriales que comprometen la fertilidad (Johnston y col., 2001; Feldman y col., 2007). Esta acción de la  $P_4$ , altera la estructura del endometrio, por lo cual el diestro es la mejor etapa del ciclo estral para diagnosticar afecciones uterinas subclínicas como la ES (Gunnink, 1973; Dhaliwal y col., 2001; Johnston y col., 2001). Una de las afecciones asociada a la acción de la  $P_4$  sobre el útero es el complejo HEQ-piometra, afección hormonodependiente que afecta más frecuentemente a hembras sexualmente maduras, de edad media a avanzada y a hembras jóvenes que han sido tratadas con progestágenos (Johnston y col., 2001; Feldman y col., 2007; Verstegen y col., 2008). Los  $E_2$  secretados por los folículos ováricos durante el celo aumentan la expresión génica de los receptores uterinos

de P<sub>4</sub>, colaborando así con la acción de la P<sub>4</sub> en la fisiopatología de la HEQ (Kastner, 1990; Silva-Molano y Loaiza-Echeverri, 2007). Una vez instaurada la HEQ, si ocurre invasión y multiplicación bacteriana evoluciona a una piometra. Esta es una de las afecciones reproductivas más importantes en la hembra canina, tanto por su prevalencia como por su morbilidad y mortalidad. Cuando ocurre HEQ sin piometra concomitante la perra presenta una afección uterina subclínica, cuyo único signo es infertilidad o subfertilidad. La HEQ era considerada la enfermedad uterina subclínica más frecuente en la perra (Johnston y col., 2001; Verstegen y col., 2008). Sin embargo, en los últimos años algunos estudios han planteado la hipótesis de que esta afección no fuera la afección endometrial subclínica más frecuente en caninos. La ES ha tomado relevancia en caninos en los últimos años, por lo cual hay muchos tópicos por abordar (prevalencia, fisiopatología y diagnóstico) que aún permanecen desconocidos.

En las distintas especies domésticas, el diagnóstico de ES se realiza por BU y/o CE. El conocimiento de las características histológicas del útero canino normal es requisito para la para evaluación e interpretación de las BU. El útero está formado por tres capas histológicas: la mucosa o endometrio, la muscular o miometrio y la serosa o perimetrio. El endometrio es la capa interna, posee un revestimiento epitelial columnar o cuboidal simple seguido de una lámina propia compuesta por tejido conjuntivo, vascular y glándulas endometriales tubulares simples que se abren hacia la luz del útero (Aughey y Frye, 2001). El endometrio presenta una porción basal y una porción funcional. La porción basal no responde a los estímulos hormonales de la P<sub>4</sub> y a partir de ella se regenera la mucosa. La

porción funcional responde a la acción de la  $P_4$  y está conformada por los estratos compacto y esponjoso (Figura 1. 1.).

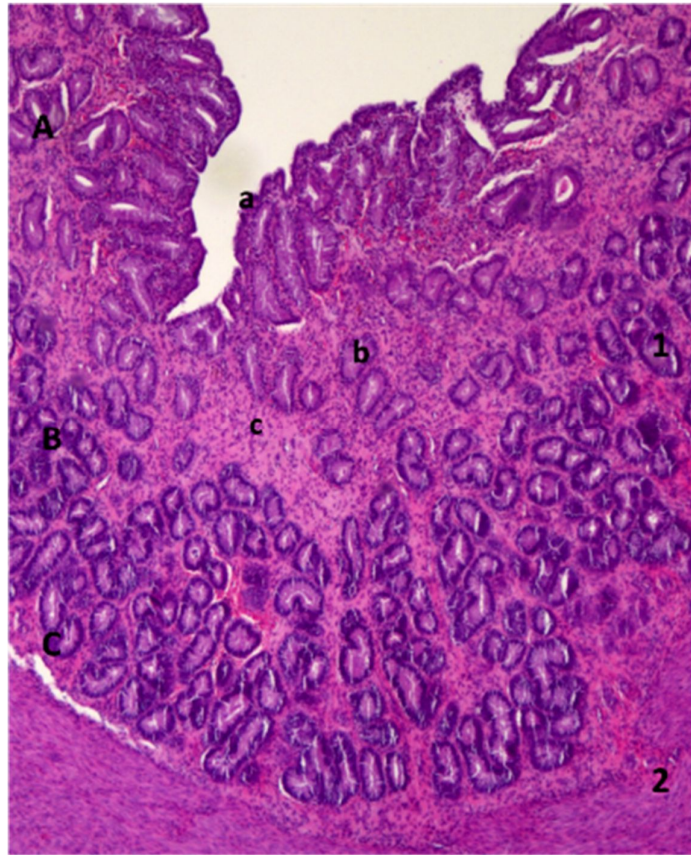


Figura 1. 1. Corte histológico de útero NOR de perra en el cual se pueden observar las diferentes capas del endometrio y las estructuras que lo componen. Objetivo 4X, Tinción H&E. 1) Endometrio, 2) Miometrio, A) estrato compacto, B) estrato esponjoso o porción glandular intermedia, C) porción glandular basal, a) epitelio superficial columnar simple, b) glándula endometrial, c) intersticio.

En la yegua y en la vaca, para la toma de muestras endometriales se han desarrollado técnicas transcervicales a fin de obtener mediante metodologías poco invasivas, muestras para estudios citológicos e histológicos del endometrio. En 1981, Doig y col. evaluaron biopsias endometriales de yeguas subfértiles o infértiles y las clasificaron de acuerdo con el tipo de lesión. Los mencionados autores observaron que la biopsia endometrial permitía no solo arribar a

diagnóstico del grado de lesión, sino también establecer la probabilidad de preñez (Doig y col., 1981). Más tarde, Kenney y Doig clasificaron las BU en cuatro categorías, basándose en la localización de las lesiones y en los tipos celulares encontrados. Con esta clasificación se otorga un valor pronóstico de la capacidad del endometrio para permitir la implantación, mantener la gestación y finalizar con un feto a término (Kenney y Doig, 1986; Rivera Cantero, 2003; Sertich, 2007). Si bien se han realizado algunos estudios de BU en la perra, no se han definido claramente los parámetros asociados al grado de lesión endometrial habiendo algunas controversias en relación a los hallazgos de los diferentes autores, tal vez porque en los estudios realizados no se ha incluido como factor de variación al momento del ciclo estral (Christensen y col., 2012; Mir y col., 2013; Gifford y col., 2014).

Como se mencionó anteriormente, además de la histología uterina, la CE es utilizada para la aproximación diagnóstica de ES en bovinos y equinos. Se ha comprobado que el porcentaje de neutrófilos estimado sobre la población de células endometriales permite evaluar el grado de inflamación endometrial (Gilbert y col., 2005; Overbeck y col., 2011; Overbeck y col., 2013). En la perra, la toma de muestras transcervicales, tal como se realiza en grandes animales, es dificultosa, ya que la anatomía de su tracto reproductivo hace que la maniobra sea compleja y sólo realizable mediante endoscopia utilizando endoscopio rígido. La vagina canina es muy larga, presenta una porción caudal y una porción craneal mucho más estrecha. La vagina craneal está limitada en la parte anterior por el cérvix y el fórnix o fondo de saco, este último ubicado en la porción craneoventral, siendo la parte más profunda de la vagina. La mucosa vaginal forma pliegues

longitudinales cuya imagen macroscópica varía en las diferentes fases del ciclo (Sisson y Grossman, 1982; Johnston y col., 2001). La vagina canina presenta un pliegue de mucosa medio en dorsal, el cual dificulta la visualización del cuello uterino (Watts y Wright, 1995; Figuras 1. 2., 1. 3. y 1. 4.). Es así que se han realizado escasos trabajos de investigación utilizando la toma de muestras transcervicales en la perra, ya que se necesita personal altamente capacitado y equipamiento costoso (Watts y col., 1996; Watts y col., 1998; Fontaine y col., 2009; Christensen y col., 2012). El método de toma de muestras uterinas más utilizado en caninos es quirúrgico, mediante laparotomía por línea media, ya que es de fácil realización y permite obtener muestras de todas las capas uterinas, permitiendo evaluar no sólo endometrio sino también, miometrio y perimetrio. Si comparamos este método con la toma de muestras mediante endoscopia transcervical, veremos que con este último se obtiene sólo el endometrio. Además, la laparotomía permite la visualización de los ovarios y el útero, permitiendo obtener datos valiosos en la aproximación diagnóstica de infertilidad/subfertilidad (Schlafer, 2012). Sin embargo, posee como desventaja el ser un método invasivo, requiere someter al animal a un protocolo anestésico y debe ser realizado en el quirófano.

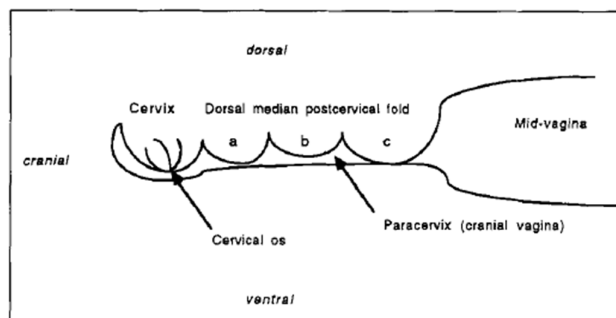




Figura 1. 2. Anatomía de la vagina craneal de la perra. El esquema muestra los tubérculos craneal (a), medio (b) y caudal (c) del pliegue de mucosa dorsal portcervical (Adaptado de Watts y Wright, 1995).

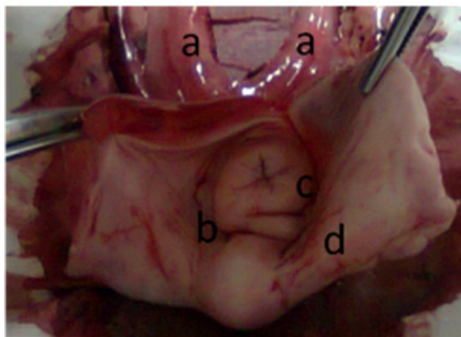


Figura 1. 3. Imagen de cérvix y fondo de vagina de la perra en la cual podemos observar a) cuernos uterinos, b) fórnix, c) cérvix, d) pared vaginal.



Figura 1.4. Vista lateral del cérvix y fondo de saco de la vagina canina.

Hasta el momento no se conoce completamente la fisiopatología de la ES, existiendo aún muchos tópicos por dilucidar en las diferentes especies. En la vaca, estudios realizados han mostrado que no hay incubencia bacteriana en el desarrollo de la ES (Madoz, 2013). Por el contrario, en la yegua se ha comunicado compromiso bacteriano en la fisiopatología de la enfermedad (Nielsen, 2005; LeBlanc, 2009; Interian y col., 2014). Si bien una gran variedad de bacterias entre las que se encuentran: *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Escherichia coli*, *Pasteurella* spp., *Proteus* spp., *Corynebacterium* spp., *Pseudomonas* spp., *Klebsiella* spp. y *Mycoplasmas* spp., han sido aisladas del tracto genital de la perra

(Olson y Mather, 1978; Watts y Wright, 1995; Watts y col., 1996). Sin embargo, no se ha establecido la implicancia bacteriana en la ES en la perra.

Por otra parte, las PFAs son consideradas marcadores útiles de la inflamación en el diagnóstico clínico, pronóstico y monitoreo de tratamiento en diversas patologías tanto agudas como crónicas (Martínez-Subiela y col., 2004; Martínez-Subiela y Cerón, 2005). En la especie canina prometen ser de gran utilidad para evaluar el estado de salud de los animales, habiéndose afirmado incluso que en el futuro las PFAs serán incluidas como un parámetro de rutina en los perfiles bioquímicos que se realicen a los animales (Eckersall y col., 2001).

Si bien el impacto de la ES sobre la eficiencia reproductiva y su repercusión sobre las pérdidas productivas se encuentra bien definido en equinos y bovinos, no ocurre lo mismo en caninos. Tal vez este hecho se encuentre relacionado con el enfoque individual que ha tenido la medicina en el área de pequeños animales en la cual los criaderos de perros no eran tomados como unidades productivas y los estudios clínicos han carecido del enfoque poblacional/productivo en el área reproductiva. Sin embargo, en la última década, la creciente demanda por parte de los criadores de métodos que les permitan resolver problemas de subfertilidad e infertilidad en perras y así optimizar la eficiencia reproductiva de su plantel, ha impulsado el estudio de afecciones que afectan la eficiencia reproductiva, así como el desarrollo de nuevas metodologías diagnósticas. El estudio de la BU junto con la CE, así como el estudio de agentes bacterianos implicados permitiría obtener datos importantes relacionados con la ocurrencia de ES en la perra y estimar así su importancia como causa de subfertilidad o infertilidad en esta especie. Asimismo, el estudio de la proteína C-reactiva como potencial indicador

de un mayor riesgo de ocurrencia de ES permitiría obtener un método valioso de aproximación diagnóstica en la ES. Los datos obtenidos podrían ser de gran valor para estimar el impacto productivo de la ES en los planteles reproductivos caninos.

En virtud de lo anteriormente expuesto, el objetivo general de esta tesis fue conocer la prevalencia de ES en la perra. Los objetivos específicos de esta tesis fueron: 1) Evaluar si el grado de inflamación subclínica diagnosticada por la técnica de CE mediante *cytobrush* se correlaciona con cambios en la histología uterina mediante la evaluación de BU (capítulo II); 2) Determinar los principales agentes etiológicos causantes de ES en la perra (capítulo III); 3) Evaluar la concentración sérica de proteína C reactiva en perras con y sin ES (capítulo IV). Para cumplir con estos objetivos se realizaron tres experimentos que se describen en los capítulos siguientes.

## **CAPÍTULO II**

### **DETERMINACIÓN DE LA PREVALENCIA DE ENDOMETRITIS SUBCLÍNICA EN LA PERRA, Y COMPARACIÓN DE LA SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DEL DIAGNÓSTICO DE ENDOMETRITIS SUBCLÍNICA POR CITOLOGÍA ENDOMETRIAL EN COMPARACIÓN CON LA BIOPSIA UTERINA**

#### **INTRODUCCIÓN**

La ES es una afección uterina que causa grandes pérdidas económicas en vacas y en yeguas debido a que produce subfertilidad o infertilidad, relacionada con fallas en la implantación y muertes embrionarias (Kasimanickam y col., 2005; LeBlanck y Causey, 2009, Madoz y col., 2014).

En la perra, se ha comunicado que el complejo HEQ-piometra es una de las lesiones uterinas más frecuentes (Dow, 1958, Schlafer, 2012). Asimismo, la HEQ sin desarrollo de piometra ha sido considerada como la enfermedad uterina subclínica de mayor prevalencia en caninos (Dow, 1958, Verstegen y col., 2008; Schlafer, 2012). Sin embargo, en la última década, algunos investigadores han demostrado que la ES es un hallazgo común en la BU (Christensen y col., 2012; Mir y col., 2013; Gifford y col., 2014). Las lesiones uterinas, ya sean inflamatorias, hiperplásicas o neoplásicas, han sido consideradas como causas potenciales de infertilidad en la perra (Johnston y col., 2001). En este sentido, Fontaine y col. sugieren que la ES debe investigarse en cada caso de infertilidad de origen desconocido en perras (Fontaine y col., 2009).

La BU es una herramienta que se utiliza ampliamente para el diagnóstico de afecciones uterinas y/o la evaluación de la integridad uterina tanto en la yegua como en la vaca (Kenney y Doig, 1986; Madoz y col., 2014). Existen numerosos trabajos en los cuales se ha realizado BU para arribar a diagnóstico de ES en las mencionadas especies (Chapwanya y col., 2010; Overbeck y col., 2013; Madoz y col., 2014). Asimismo, la BU puede brindar información valiosa que permita detectar cambios fisiológicos, inmunológicos o patológicos en el útero (Chapwanya y col., 2010). En yeguas, la BU es utilizada para el diagnóstico de afecciones uterinas, con valor pronóstico sobre la fertilidad de la hembra (Kenney y Doig, 1986; Doig y Waelchli, 1993).

En las últimas dos décadas se han realizado diferentes estudios con el objetivo de desarrollar un método de diagnóstico sencillo, económico, rápido y eficaz de ES. La CE es una herramienta utilizada para el diagnóstico de ES considerándose al *cytobrush* como la mejor técnica para la recolección de muestras endometriales (Kasimanickam y col., 2005; Plontzke y col., 2010; Cocchia y col., 2012; Wagener y col., 2017). Es así que, los estudios realizados han sugerido a la CE realizada mediante la técnica de *cytobrush* como la mejor herramienta para la toma de muestras uterinas.

Los estudios realizados en las diferentes especies sugieren que la ES podría comportarse en la perra de manera similar a lo que ocurre en la yegua y en la vaca y que muchas de las perras presentadas a consulta por problemas de infertilidad o subfertilidad podrían presentar ES. Por consiguiente, el conocimiento de la ocurrencia de ES en la perra, así como la evaluación de la sensibilidad y

especificidad del *cytobrush* y su correlación con la BU podrían aportar datos valiosos en la aproximación diagnóstica de la subfertilidad/infertilidad en caninos.

### **OBJETIVOS**

- 1) Conocer la prevalencia de ES en la perra.
- 2) Evaluar si el grado de inflamación subclínica diagnosticado por la técnica de CE mediante *cytobrush* se correlaciona con cambios en la histología uterina mediante la evaluación de BU.

### **HIPÓTESIS**

- 1) La prevalencia de ES en caninos es similar a la prevalencia de esta entidad patológica en bovinos y equinos;
- 2) Los cambios inflamatorios detectados en las muestras citológicas obtenidas por el *cytobrush* se corresponden con los cambios histológicos endometriales observados con la BU;

### **MATERIALES Y MÉTODOS**

#### ***Diseño experimental***

Se utilizaron 50 perras clínicamente sanas, mestizas, de entre 8 meses y 6 años, con un peso entre 10 y 30 Kg, pos-púberes, de ciclos estrales regulares, en diestro, que no habían recibido anticonceptivos. Las perras seleccionadas formaron parte de un plan de control urbano de la reproducción realizado en un centro municipal (Centro de zoonosis, Municipalidad de La Plata, Buenos Aires,

Argentina). Cada una de ellas asistió al centro municipal para ser sometidas a ovariectomía.

### ***Procesamiento y toma de muestras***

A cada una de las perras se le realizó un examen clínico general y se le tomó una muestra para estudio citológico vaginal y una muestra de sangre para posterior medición de P<sub>4</sub> sérica. El momento del ciclo se determinó en base a la fecha del último celo relatada por el propietario, la citología vaginal, la presencia o no de CL en los ovarios (Figura 2. 1.) y la concentración de P<sub>4</sub> sérica. El diestro fue dividido en tres etapas, DTE (hasta 20 días post-celo), DME (entre 21 y 40 días post-celo) y DTA (más de 41 días post-celo). Luego de la ovariectomía, los úteros y los ovarios de las perras fueron remitidos al Laboratorio de Reproducción Animal de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata para su estudio. Cada útero con sus correspondientes ovarios fueron examinados. Se observaron los ovarios y se registró la presencia de CL. Se tomó una muestra de cada cuerno uterino mediante punch de 0,4 cm de diámetro para su estudio histopatológico (Figura 2. 1) y una muestra de CE mediante la técnica de *cytobrush* para su estudio citológico (Madoz, 2011; Schlafer, 2012).

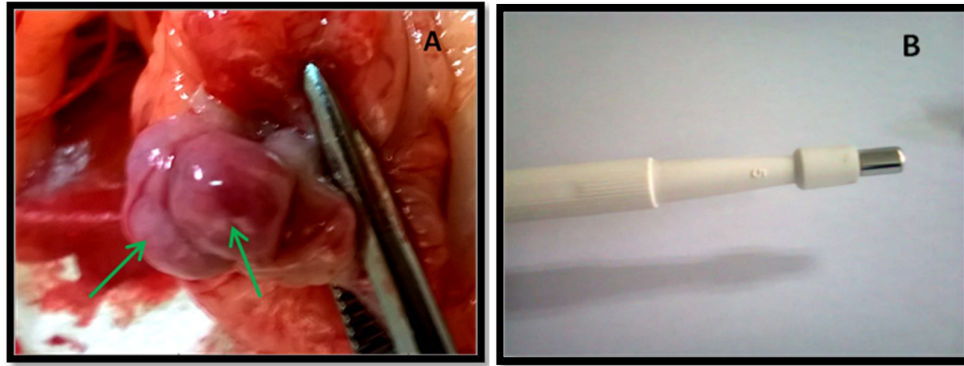


Figura 2. 1. Procesamiento y toma de muestras. A) Presencia de CL (flechas verdes) en ovario; B) Punch para obtención de BU.

#### *Biopsia uterina*

Las BU obtenidas fueron colocadas en tubos plásticos con tapa (1,5 ml) con solución formolada tamponada al 10% hasta su procesamiento histológico. Posteriormente en el laboratorio, las muestras fueron deshidratadas, incluidas en parafina, cortadas con micrótopo y teñidas con H&E para su observación (Madoz, 2011). Las muestras obtenidas fueron evaluadas a 100, 400 y 1000 X al MO.

#### *Citología vaginal y endometrial*

Las muestras de citología vaginal obtenidas fueron depositadas sobre un portaobjetos, fijadas para preservar la morfología celular, y coloreadas con Tinción 15<sup>®</sup> (Biopur, Argentina). Las muestras se dejaron 5" en cada colorante obteniéndose una buena tinción celular. Luego fueron evaluadas al MO a 100X y 400X para realizar el conteo de células parabasales, intermedias y superficiales. Se determinó el momento del ciclo estral de acuerdo con el porcentaje y tipo de células presentes (Feldman y Nelson, 1987; Stornelli y col., 2012).

Las muestras obtenidas con la técnica de *cytobrush* fueron depositadas sobre un portaobjetos, fijadas para preservar la morfología celular y coloreadas con



Tinción 15<sup>®</sup> (Biopur, Argentina, [Madoz, 2011]). Las muestras se dejaron 15" en cada colorante, ya que 5" fueron insuficientes para obtener una buena coloración de las células endometriales. Todas las muestras obtenidas fueron evaluadas a 100, 400 y 1000 X al MO (Figura 2. 2).

Se realizó el conteo de PMNN sobre un total de 200 células en las muestras de CE para obtener el porcentaje de PMNN en relación con las células endometriales.

Se tomaron dos puntos de corte, uno de 2% y otro de 5%. Cuando el porcentaje de neutrófilos fue  $\geq 2\%$  en la CE, se consideró a la muestra como ES +, mientras que cuando el porcentaje fue  $< 2\%$  se consideró como endometrio NOR (Overbeck y col., 2013). Asimismo, cuando el porcentaje de neutrófilos fue  $\geq 5\%$  en la CE, se consideró a la muestra como ES +, mientras que cuando el porcentaje fue  $< 5\%$  se consideró como endometrio NOR.

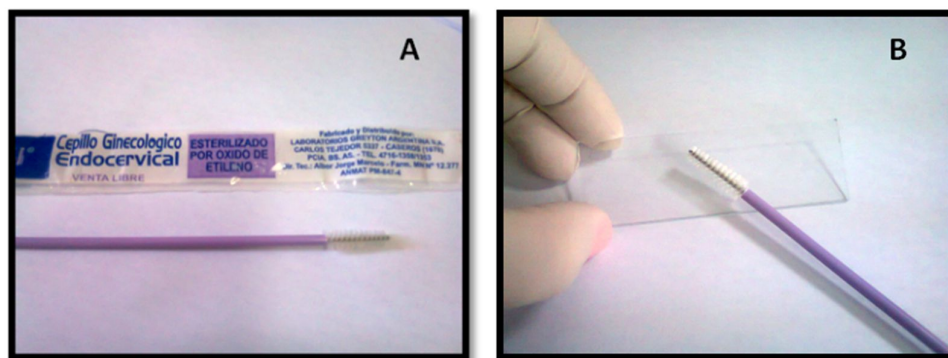


Figura 2.2 Imágenes de elementos para CE. A) Cepillo ginecológico para obtención de muestras citológicas de endometrio; B) Extendido citológico de la muestra obtenida mediante la técnica de *cytobrush*.

### *Medición de progesterona sérica*

Las muestras de sangre obtenidas fueron centrifugadas y el suero almacenado a -20°C hasta su procesamiento.

Las mediciones de P<sub>4</sub> fueron realizadas mediante quimioluminiscencia (Elecsys®, Progesterone II; Roche, Mannheim, Germany). El coeficiente de variación intraensayo para el pool alto (4,87 ng/ml) y para el pool bajo (0,3 ng/ml) fue 4,5% y 2% respectivamente.

### *Análisis estadístico*

Se realizó el análisis exploratorio de los datos, calculando la frecuencia de perras con ES, endometrio NOR, HEQ y otras afecciones. Los datos fueron expresados como CMM  $\pm$  error estándar (CE y concentración de P<sub>4</sub> sérica) o como porcentaje (BU). Las variaciones en las concentraciones de P<sub>4</sub> se explicaron ajustando un modelo de regresión con distribución Poisson (PROC GLIMMIX; SAS, 2003) con la categoría de BU como único predictor fijo, considerando a la perra como unidad experimental. Se estimaron los CMM de los grupos de BU y se evaluó la diferencia de CMM entre las categorías ES y NOR.

### *Marco bioético del uso de animales*

El experimento se realizó respetando y de acuerdo con las recomendaciones internacionales especificadas en la Guía para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio, con las recomendaciones de la National Academy Science, Washinton DC, USA referidas al uso de perros como animales de laboratorio (National Research, 2010) y las recomendaciones sobre el cuidado y uso de animales de laboratorio del Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales

de Laboratorio (CICUAL) de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata (Resolución: 42-5-14 T).

## RESULTADOS

De las 50 perras estudiadas 10 se encontraban en DTE, 14 en DME y 26 en DTA. La tabla 2. 1 muestra la etapa del diestro en la cual se encontraban las perras con los diferentes resultados histopatológicos en el momento de la toma de muestra (Tabla 2. 1).

Tabla 2. 1. Etapa del diestro de las perras en el momento de la toma de muestra.

Condición	DTE	DME	DTA
NOR	5/18	5/18	8/18
ES	4/27	7/27	16/27
HE	1/2	-	½
O	-	2/3	1/3

DTE: diestro temprano, DME: diestro medio, DTA: diestro tardío. NOR: normal, ES: endometritis subclínica, HE: hiperplasia endometrial, O: otras afecciones.

### *Biopsia uterina*

A partir de la observación al MO las muestras se clasificaron en:

- 1) NOR: aquellas muestras donde se evidenció endometrio con pliegues longitudinales de mucosa, epitelio endometrial superficial intacto, tejido conjuntivo formando la lámina propia con glándulas endometriales de estructura

conservada (Figura 2. 3); 2) HEQ: cuando se observó proliferación de las glándulas endometriales, de tamaño y forma irregulares con distensión de la luz glandular (Figura 2. 4); 3) ES: aquellas muestras donde se observó degeneración, necrosis y/o descamación de las células del epitelio endometrial superficial, hemorragia, hiperemia y/o congestión, así como edema en lámina propia, en diferentes grados. La ES fue clasificada como: a) ES aguda (ESA): cuando se observó moderada a severa hiperemia y/o congestión, hemorragia, así como un infiltrado celular inflamatorio difuso (PMNN; Figura 2. 5) b) ES subaguda (ESSA): cuando se observó moderada a severa hiperemia y/o congestión, hemorragia junto a un infiltrado celular inflamatorio en el que además de neutrófilos, se observaron linfocitos y macrófagos con o sin hemosiderina (Figura 2. 6); y c) ES crónica (ESC): cuando se observó presencia de linfocitos y macrófagos, hiperplasia de tejido conectivo, en ocasiones con atrofia de las glándulas endometriales, leve a moderada hiperemia y/o congestión (Figura 2. 7). Asimismo, en aquellas muestras con presencia de hemorragia moderada se observaron abundantes macrófagos con hemosiderina.

De las 50 perras estudiadas, 18 presentaron imagen histológica de endometrio NOR, 27 presentaron imagen histológica de ES, 2 presentaron imagen histológica de HEQ y 3 perras presentaron otras afecciones (Fibrosis, atrofia de mucosa). De las 27 perras con ES, 8 presentaron ESA, 7 ESSA y 12 ESC.

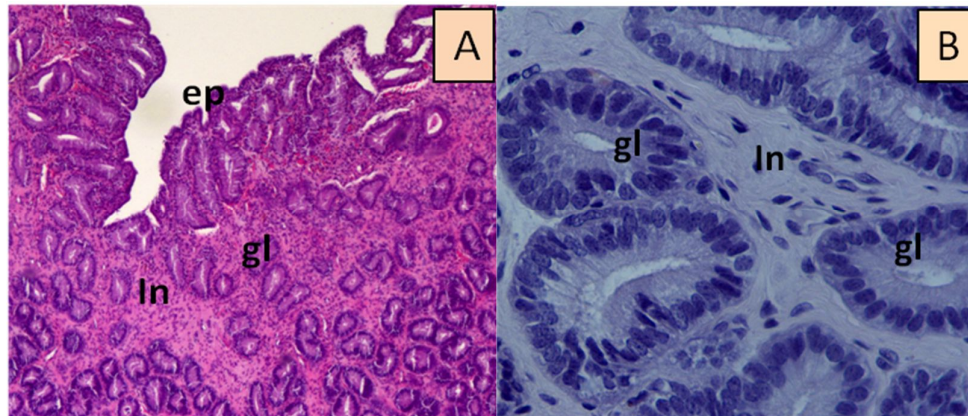


Figura 2. 3. Microfotografías de BU teñidas con H&E, Endometrio normal. A) Imagen de endometrio normal, Objetivo 4X. B) Endometrio normal, Objetivo 60X. Se observan las glándulas uterinas (gl) de estructura conservada, tamaño normal. El epitelio de superficie (ep) con solución de continuidad, intersticio (In) con escasas células inflamatorias.

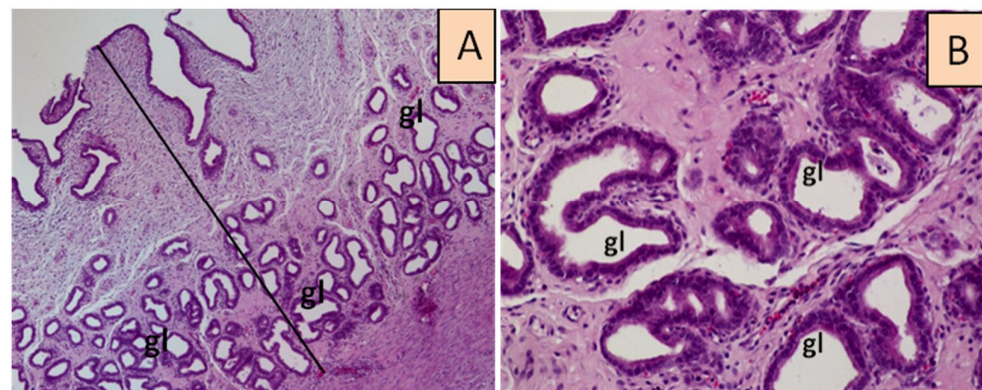


Figura 2. 4. Microfotografías de BU teñidas con H&E, HEQ. A) Imagen de HEQ, Objetivo 4X. B) HEQ, Objetivo 40X. Imágenes de hiperplasia endometrial en la cual se observan (gl) glándulas uterinas hiperplásicas e hipertróficas, irregulares y con distensión de su luz. La línea recta marca el engrosamiento del endometrio.



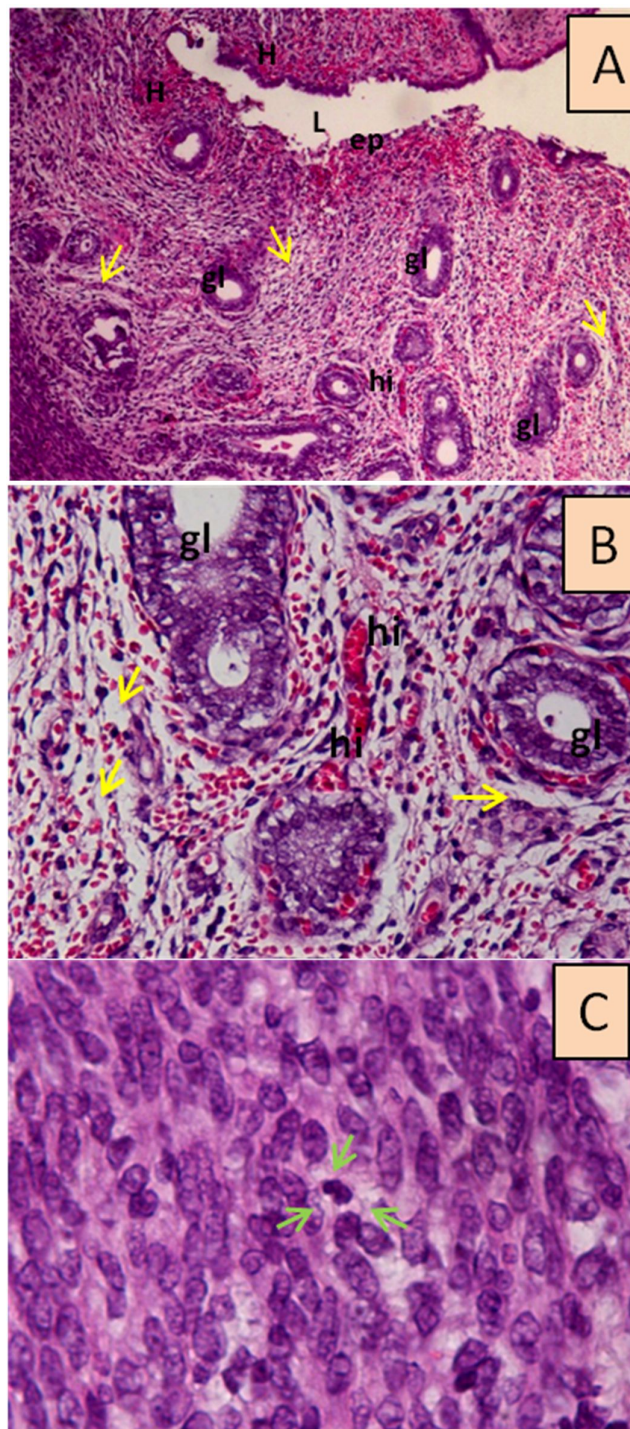


Figura 2. 5 Microfotografías de BU teñidas con H&E, ESA. A) Imagen de ESA, Objetivo 10X. B) ESA, Objetivo 40X. C) ESA, Objetivo 100X. Lúmen uterino (L), epitelio (ep), glándulas uterinas (gl), hiperemia (hi), hemorragia (H). Las flechas amarillas marcan edema en el estroma. Las flechas verdes marcan infiltrado PMNN.

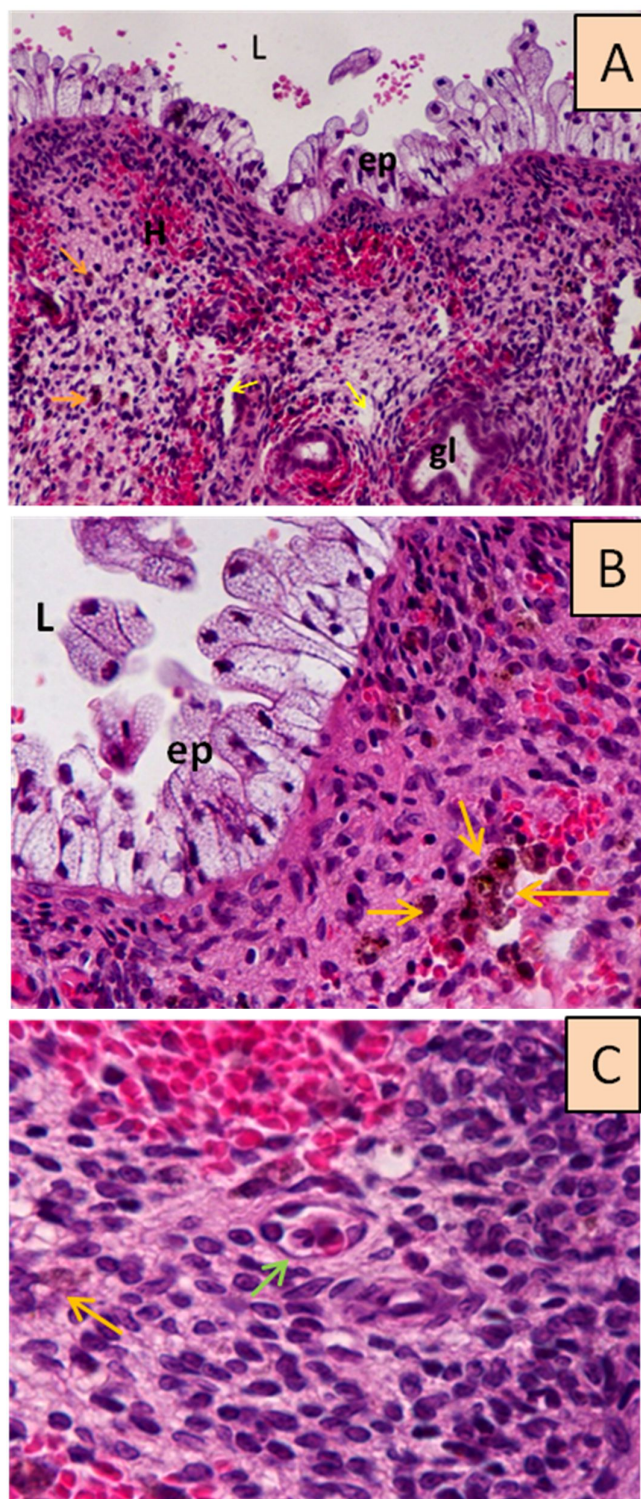


Figura 2. 6. Microfotografías de BU teñidas con H&E, ESSA A) ESSA, Objetivo 20X. B) ESSA, Objetivo 40X. C) ESSA, Objetivo 100X. Lúmen uterino (L), epitelio (ep), glándulas uterinas (gl), hemorragia (H). Las flechas amarillas marcan edema en el estroma. Las flechas naranjas marcan hemosiderina. La flecha verde marca un neutrófilo.



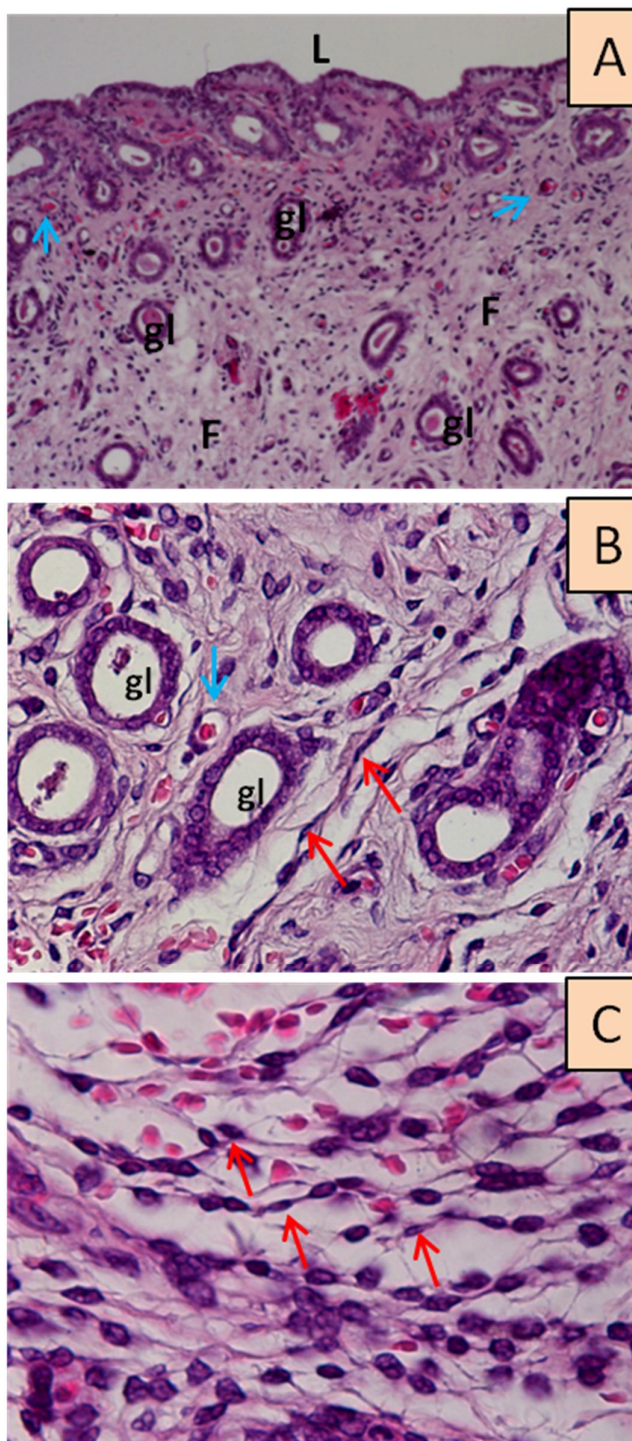


Figura 2. 7. Microfotografías de BU teñidas con H&E, ESC. A) ESC, Objetivo 20X. B) ESC, Objetivo 60X. C) ESC, Objetivo 100X. Lúmen uterino (L), glándulas uterinas (gl), fibrosis (F). Las flechas celestes marcan los vasos de noviformación. Las flechas rojas marcan fibrocitos.



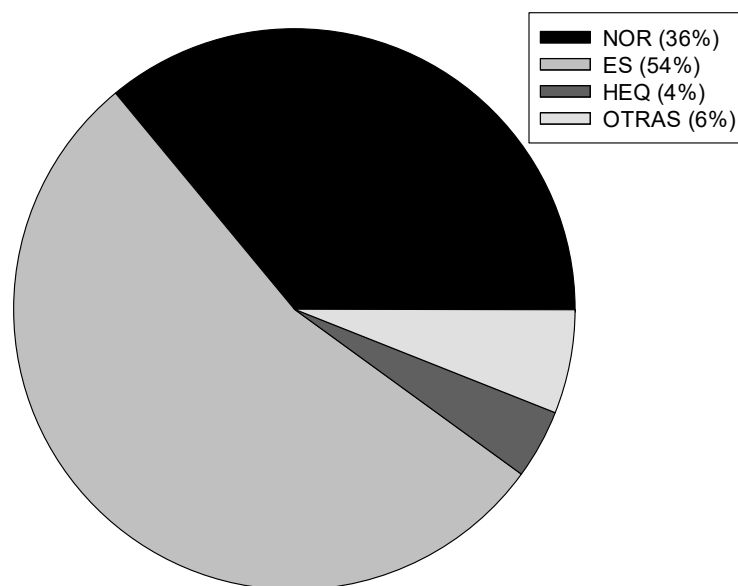


Figura 2. 8. Porcentajes de afecciones uterinas observadas en el estudio histopatológico. NOR: normal; ES: endometritis subclínica; HE: hiperplasia endometrial; OTRAS: otras afecciones.

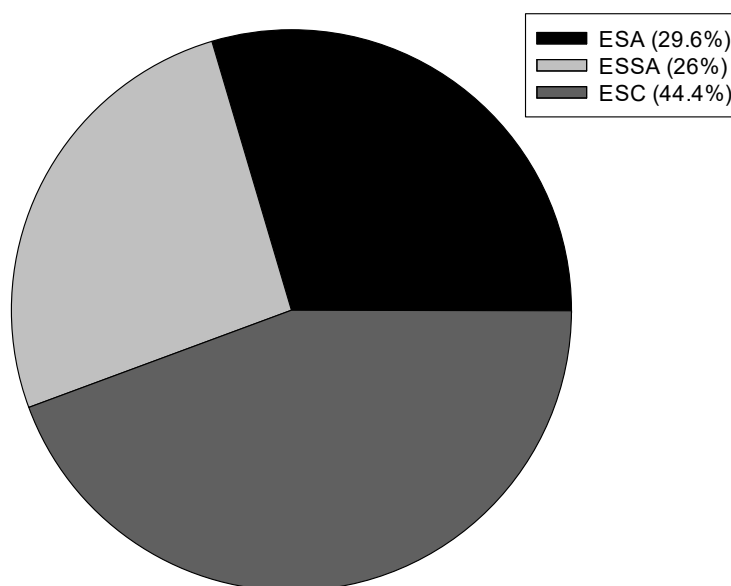


Figura 2. 9. Porcentajes y tipos de ES observadas en el estudio histopatológico. ESA: ES aguda; ESSA: ES subaguda; ESC: ES crónica.

### Citología endometrial

El estudio citológico endometrial permitió identificar células del epitelio endometrial y células inflamatorias (Figura 2. 6). El porcentaje de PMNN observado en la CE fue mayor en el grupo NOR respecto al grupo ES ( $4.21 \pm 0.36$  vs.  $2.27 \pm 0.20$ ;  $P < 0.0001$ ; Figura 2. 7). Cuando se comparó el porcentaje de PMNN entre los grupos NOR y ESA no se observaron diferencias ( $4.21 \pm 0.36$  vs.  $3.73 \pm 0.48$ ;  $P=0.44$ ). El porcentaje de PMNN fue mayor en el grupo NOR respecto a los grupos ESSA y ESC ( $4.21 \pm 0.36$  vs.  $2.02 \pm 0.38$ ,  $P<0.001$ ;  $4.21 \pm 0.36$  vs.  $1.37 \pm 0.25$ ,  $P < 0.0001$ , respectivamente; Figura 2. 8).

Cuando las hembras fueron clasificadas como NOR o con ES mediante estudio citológico o histopatológico se observaron diferencias significativas en la asignación de la categoría NOR o ES ( $P<0.0001$ ). Se observó un bajo grado de acuerdo entre el resultado obtenido en la CE de muestras obtenidas por *cytobrush* y el resultado obtenido a partir de la observación y categorización diagnóstica de las BU. El Coeficiente Kappa fue de -0.19 cuando se tomó el punto de corte en 2% y de -0,08 cuando se tomó el punto de corte en 5%.

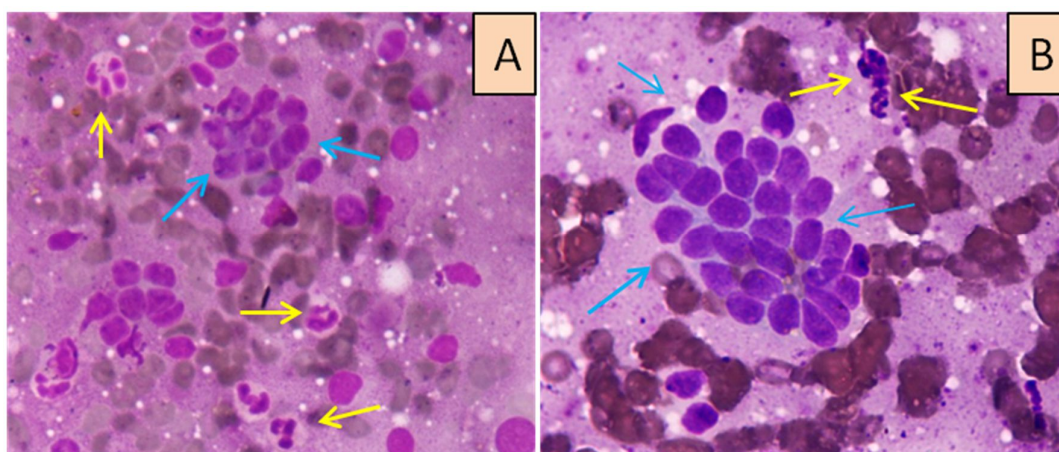


Figura 2. 10. Microfotografías de CE. Las flechas celestes marcan las células endometriales descamadas en grupo y las flechas amarillas neutrófilos. A) Objetivo 40X; B) Objetivo 100X; Tinción 15<sup>®</sup>.

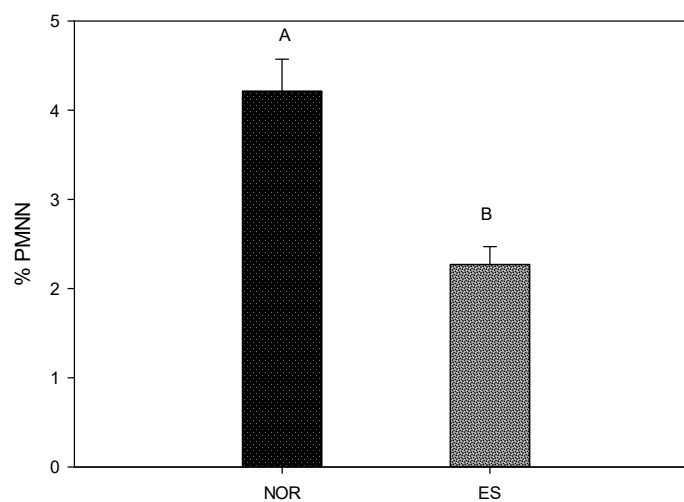


Figura 2. 11. Porcentaje de PMNN en la CE de perras con endometrio NOR y perras con ES (CMM ±error estándar). Letras diferentes indican diferencias significativas,  $P \leq 0,05$ .

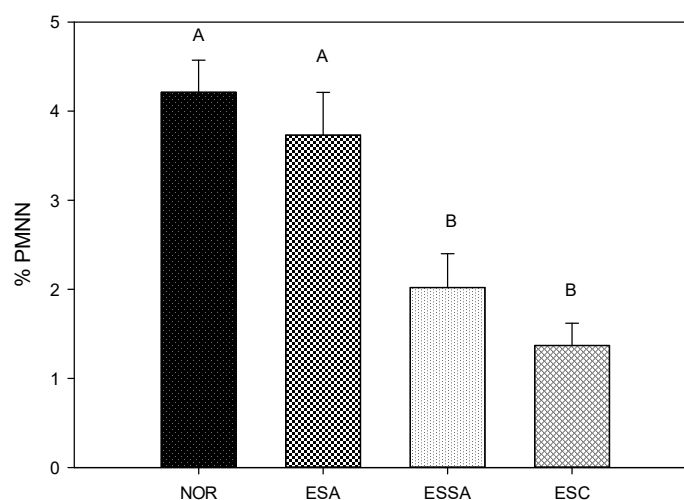


Figura 2. 12. Porcentaje de PMNN en CE de perras con endometrio NOR y perras con ESA, ESSA y ESC (CMM  $\pm$  error estándar). Letras diferentes indican diferencias significativas,  $P \leq 0,05$ .

### *Progesterona sérica*

El promedio de las concentraciones séricas de  $P_4$  fue de  $11.30 \pm 2.24$  ng/ml.

El promedio de las concentraciones séricas de  $P_4$  en perras con y sin ES fueron diferentes ( $9,08 \pm 0,61$  frente a  $16,71 \pm 1,05$  ng/ml, respectivamente,  $P < 0,001$ ; Figura 2. 9).

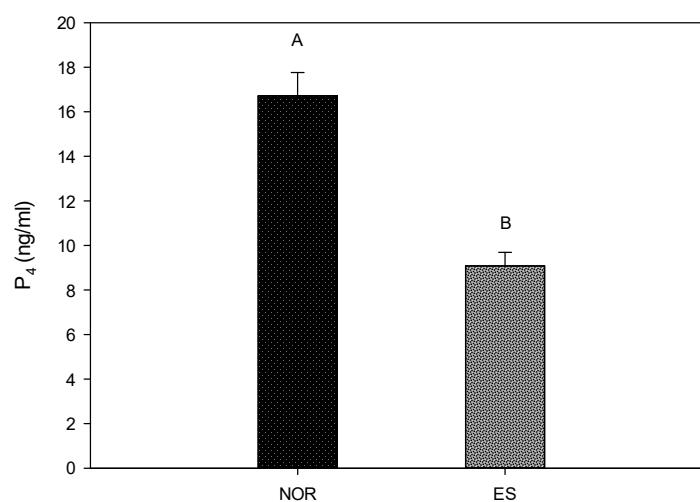


Figura 2. 13. Concentraciones de  $P_4$  en perras con endometrio NOR y perras con ES (CMM  $\pm$  error estándar). Letras diferentes indican diferencias significativas,  $P \leq 0,05$ .

## DISCUSIÓN

Se define como infertilidad a la incapacidad de concebir y producir una cría viable. En la perra, el término subfertilidad implica una menor tasa de preñez y un menor tamaño de camada que lo esperado para perras fértiles de la misma raza (Grundy y col., 2002; Wilborn y Maxwell, 2012). Como se mencionó previamente, los procesos inflamatorios endometriales subclínicos pueden producir infertilidad en la perra al causar fallas en la concepción por provocar un medio ambiente inadecuado para la supervivencia espermática y la interacción entre espermatozoide-ovocito, o por causar pérdidas embrionarias tempranas al interferir con la implantación (Johnston y col., 2001). Actualmente, la HEQ es considerada como la principal causa de infertilidad en la perra (Verstegen y col., 2008). Nuestro estudio muestra una alta prevalencia de ES siendo considerablemente mayor a la de HEQ. Asimismo, se observa una prevalencia de HEQ menor que la observada por otros autores quienes comunicaron la ocurrencia de entre el 15 y 35% de esta afección (Christensen y col., 2012; Mir y col., 2013; Gifford y col., 2014). Las diferencias observadas podrían deberse al número de perras estudiadas y al estadio del ciclo estral, al momento de la toma de muestra. Mir y col., Gifford y col., y Christensen y col., recolectaron muestras en diferentes estadios del ciclo de la perra, mientras que en nuestro estudio sólo se estudiaron muestras recolectadas durante el diestro. El porcentaje de EN registrado (36%) en nuestro estudio fue mayor a lo observado por Gifford y col. (27,8%) y Mir y col. (21,5%) quienes estudiaron muestras provenientes de perras subfértiles (Mir y col., 2013; Gifford y col., 2014). Ambos autores tomaron muestras de perras con infertilidad/subfertilidad de origen desconocido. El porcentaje de ES (54%)

observado en nuestro trabajo fue similar a lo observado por Christensen y col. (50%) en perras clínicamente sanas (Christensen y col., 2012). En contraposición, Gifford y col., 2014 (43%) y Mir y col., 2013 (29%) observaron un porcentaje inferior de perras con ES en hembras infértiles/subfértiles. Las diferencias observadas pueden deberse al número de animales, así como a la categoría de pacientes incluidos en cada estudio (Tabla 2. 1).

Por otra parte, nuestros resultados muestran la ocurrencia de diferentes tipos de ES en el diestro, observándose una prevalencia mayor de ESC (44,4%) en comparación con la prevalencia observada para ESA (29,6%) y ESSA (26%). En concordancia con los mencionados hallazgos, Gifford y col., observaron ESC con mayor frecuencia 22,3% que ESA y ESSA. Sin embargo, en contraposición con nuestros resultados, en el mencionado trabajo se observó ESSA en el 12,8% de los animales con una frecuencia de aparición mayor que ESA, 7,5% (Gifford y col., 2014). Estas diferencias, como se mencionó previamente, podrían relacionarse con el momento del ciclo estral en el que se tomó la muestra, lo cual influiría sobre la prevalencia del tipo de endometritis en relación con la acción de  $E_2$  y  $P_4$  sobre el útero (Praderio y col., 2018; Stornelli y col., 2018).

En nuestro trabajo se pudo observar que el porcentaje de perras con ES fue mayor que el porcentaje de HEQ y que el porcentaje de endometrio NOR. Si bien se han observado diferencias entre los porcentajes de endometrio NOR, ES y HEQ observados en los diferentes trabajos, coincidiendo con nuestros resultados, la ES siempre fue la afección más frecuente en todos los estudios. Asimismo, en todos los trabajos se observó mayor porcentaje de ES que de EN.

En la vaca, ES refiere a vacas que no muestran signos clínicos de endometritis, pero tienen un mayor porcentaje de PMNN en la CE asociándose a una menor eficiencia reproductiva (Kasimanickam y col., 2004). Sin embargo, Madoz y col. encontraron un bajo grado de acuerdo entre los resultados obtenidos por CE en muestras colectadas mediante la técnica de *cytobrush* y los resultados obtenidos por BU. Dado que existe un bajo grado de acuerdo entre los resultados de la BU y la CE, estos autores concluyen que la CE no parece ser tan útil para el diagnóstico de ES. Es así que, la BU se usa para evaluar el estado histológico de todas las capas endometriales, mientras que la CE se usa para evaluar solo la capa superficial del endometrio (Madoz y col., 2014). En contraposición, Overbeck y col. en un estudio realizado en yeguas, comunicaron acuerdo entre el número de PMNN de la CE y la aparición de PMNN en el estrato compacto a partir del examen histológico en el mismo lugar de muestreo (Overbeck y col., 2013). En la perra, no se han realizado estudios que comparen los hallazgos obtenidos en la BU con la CE. Según nuestro conocimiento, solo hay un estudio realizado para el diagnóstico de endometritis por CE (Fontaine y col., 2009). Los investigadores estudiaron 26 perras infértiles en diferentes etapas del ciclo estral (proestro, diestro y anestro) y encontraron 38% (10/26) de perras con endometritis (Fontaine y col., 2009). Nuestros resultados mostraron un alto porcentaje de PMNN en la CE de perras con BU clasificadas como NOR y ESA. En contraste, se encontró un bajo porcentaje de PMNN en muestras citológicas de perras con BU clasificadas como ESSA y ESC. Por otra parte, se observó un bajo grado de acuerdo entre los resultados obtenidos por CE y los resultados obtenidos por BU en el diagnóstico de ES. Es así que CE no permite arribar a diagnóstico de ES en la perra. Nuestros

resultados concuerdan con los hallazgos comunicados en la vaca y se contraponen con los hallazgos observados en la yegua.

En nuestro estudio, la concentración sérica de  $P_4$  fue mayor en las perras con endometrio NOR en comparación con las perras con ES. Este hecho podría explicarse porque gran porcentaje de perras del grupo ES se encontraban en DTA al momento de la toma de muestras. No obstante, la influencia de las concentraciones séricas de  $P_4$  sobre la ocurrencia de ES no se conoce aún, es así que las menores concentraciones de  $P_4$  sérica podrían facilitar la ocurrencia de esta afección. Asimismo, en nuestro estudio el porcentaje de PMNN del endometrio fue mayor en el grupo de perras con útero normal y altas concentraciones de  $P_4$ . Sin embargo, Acuña y Fumuso observaron bajos porcentajes de PMN en hembras con altas concentraciones de  $P_4$ , explicando que la  $P_4$  posee un efecto inhibitorio sobre las células del sistema inmune en el útero (Acuña y Fumuso, 2013). Estos hallazgos coinciden con trabajos realizados en ratona, mujeres y ovejas quienes comunican el mismo efecto inhibitorio (Hunt y col., 1998; Wira y col., 2010; Intan-Shameha y col., 2011). Es posible que el efecto inhibitorio de la  $P_4$  comience a observarse en las capas más profundas del endometrio y más tarde en la superficie. Un gran número de las perras con endometrio NOR estaban en DTE, probablemente el corto periodo de altas concentraciones de  $P_4$  no fue suficiente para que la  $P_4$  provoque el efecto inhibitorio en todas las capas uterinas.



Tabla 2. 2. Diagnóstico de afecciones endometriales realizado mediante biopsia por diferentes autores.

Autor	Etapas del ciclo estral	N	ES	HEQ	NOR
<b>Praderio y col. 2018</b>	Diestro	50	54%	4%	36%
			27/50	2/50	18/50
<b>Mir y col. 2013</b>	DME-DTA-	14	29%	14,5%	21,5%
	Anestro		4/14	2/14	3/14
<b>Gifford y col. 2014</b>	Todas las etapas (67,9% en diestro)	399	42,6%	33,3%	27,8%
			170/399	133/399	111/399
<b>Christensen y col. 2012</b>	Todas las etapas	20	50%	35%	10%
			10/20	7/20	2/20

n: número de muestra; ES: endometritis subclínica; HEQ: hiperplasia endometrial quística; NOR: normal.

## CONCLUSIÓN

Nuestros resultados muestran que la prevalencia de ES en perras clínicamente sanas es alta. La ES podría ser la causa de gran parte de los problemas de infertilidad o subfertilidad tal como ocurre en otras especies. Sin embargo, se necesitan estudios de fertilidad para determinar si ES produce infertilidad o subfertilidad en la perra. Asimismo, nuestros resultados sugieren que la ES en perras, podría haber sido subestimada, tal vez porque en la mayoría de los trabajos se estudiaron perras con signología clínica de enfermedad uterina, no estudiándose la población general de perras clínicamente sanas.

Además, nuestro estudio muestra una mayor prevalencia de ES en comparación con la prevalencia de HEQ, entidad comunicada hasta el momento como la más frecuente de las alteraciones uterinas en caninos.

Por otra parte, al observarse un bajo grado de acuerdo entre los resultados de BU y CE, la CE realizada por la técnica de *cytobrush* no sería una herramienta útil para el diagnóstico de ES.

**CAPITULO III**  
**DIAGNÓSTICO BACTERIOLÓGICO DE LA ENDOMETRITIS**  
**SUBCLÍNICA EN LA PERRA.**

**INTRODUCCIÓN**

En la actualidad, la fisiopatología de la ES no se encuentra completamente dilucidada, observándose algunas diferencias entre especies. En las yeguas, las bacterias se han asociado con el desarrollo de ES (Nielsen, 2005; Interian y col., 2014). Sin embargo, en las vacas no se recomienda la bacteriología como herramienta de diagnóstico porque no se han aislado bacterias del útero de vacas con ES (Madoz y col., 2013). Gunay y col. informaron que no se aislaron bacterias del útero de perras sanas en ninguna de las etapas del ciclo estral (Gunay y col., 2010). Asimismo, Fontaine y col. aislaron bacterias del útero en la mayoría de las muestras endometriales provenientes de úteros con endometritis diagnosticada mediante CE en perras presentadas a consulta por infertilidad (Fontaine y col., 2009). De acuerdo a algunos autores, el diestro parece ser la mejor etapa para diagnosticar endometritis, ya que la impregnación de P<sub>4</sub> favorecería la alteración patológica del endometrio (Gunnink, 1973; Dhaliwal y col., 2001).

El útero normal es considerado libre de microorganismos, sin embargo, diferentes bacterias forman parte de la microbiota vaginal en caninos (Watts y col., 1996; Carneiro y col., 2005; Guerrero y col., 2018). La vecindad anatómica de la vagina y el útero permite que en etapas del ciclo estral en las cuales el cuello uterino se encuentra permeable, como proestro y estro, los microorganismos de la

microbiota vaginal asciendan hacia el útero (Johnston y col, 2001). Los microorganismos que ascienden hasta el útero normal son eliminados por el sistema inmune dadas las condiciones necesarias para que esto ocurra. Por el contrario, si la perra presenta un sistema inmune deficiente o, si el útero presenta alteración en la arquitectura y/o fisiología endometrial se vuelve susceptible a invasión bacteriana. De este modo cuando las bacterias contaminan el útero pueden provocar enfermedad, tal como ocurre en el complejo HEQ-piometra (Johnston y col., 2001).

Las discrepancias que existen en relación al aislamiento bacteriano en hembras con ES en las diferentes especies nos impulsaron a realizar un estudio con el fin de dilucidar si hay asociación entre las bacterias y el desarrollo de ES en la perra. Asimismo, creemos que en caso de haber compromiso bacteriano en el desarrollo de ES, las bacterias podrían ascender desde vagina. Es así que, se ha diseñado un experimento con el fin de aumentar el conocimiento sobre la fisiopatología de ES en la perra.

## **OBJETIVO**

Determinar los principales agentes etiológicos causantes de ES en la perra.

## **HIPÓTESIS**

Los principales agentes etiológicos uterinos aislados en perras con endometritis son similares a los aislados en las muestras de fondo de vagina.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### ***Diseño experimental***

Se seleccionaron 35 perras clínicamente sanas, mestizas, de entre 8 meses y 6 años, con un peso entre 10 y 30 Kg, pos-púberes, de ciclos estrales regulares, en diestro. Las perras seleccionadas no habían recibido tratamiento anticonceptivo previo a la toma de muestra y formaron parte de un plan de control urbano de la reproducción realizado en un centro municipal (Centro de zoonosis, Municipalidad de La Plata, Buenos Aires, Argentina). Cada una de ellas asistió al centro municipal para realizar la ovariectomía.

### ***Procesamiento y toma de muestras***

A cada una de las perras se le realizó un examen clínico general y se le tomó una muestra para estudio citológico vaginal y una muestra de sangre para posterior medición de P<sub>4</sub> sérica. El momento del ciclo se determinó en base a la fecha del último celo relatada por el propietario, la citología vaginal, la presencia o no de CL en los ovarios y la concentración de P<sub>4</sub> sérica. Antes de la ovariectomía, se obtuvo una muestra del fondo de vagina mediante hisopo estéril cubierto. Luego de la ovariectomía, los úteros y los ovarios de las perras fueron remitidos al Laboratorio de Reproducción Animal de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata para su estudio. Cada útero con sus correspondientes ovarios fueron examinados. Se observaron los ovarios y se registró la presencia de CL. Se tomó una muestra de cada cuerno uterino mediante punch de 0,4 cm de diámetro para su estudio histopatológico

(Madoz, 2011; Schlafer, 2012) y una muestra de cada cuerno uterino mediante hisopo estéril en condiciones de asepsia.

Los hisopos obtenidos con muestras del fondo de vagina y muestras del endometrio, inmediatamente después de su obtención, fueron colocados en un medio de transporte de Stuart y remitidos al laboratorio de bacteriología de la FCV-UNLP para su procesamiento (Stornelli y col., 2000). Las muestras fueron transportadas refrigeradas a 4 °C hasta el laboratorio donde se realizaron los cultivos y la identificación de las bacterias aisladas. Los hisopos fueron sembrados en un medio enriquecido (agar sangre ovina 5%) y en un medio selectivo para enterobacterias (agar Mac Conkey). Las placas fueron incubadas 72h a 37°C en aerobiosis. La identificación bacteriana se realizó fenotípicamente según las características microscópicas (coloración de Gram) y macroscópicas de las colonias: forma, tamaño, aspecto, producción de hemólisis. Se realizaron pruebas bioquímicas y fisiológicas para identificar género y especie (Barrow y col., 1993). Las muestras obtenidas mediante BU fueron procesadas como en el Capítulo II.

En base al resultado obtenido a partir de la BU, las perras fueron divididas en dos grupos, Grupo I hembras con ES (n=20) y Grupo II hembras con endometrio NOR (n=15). Se realizó el análisis exploratorio de los datos, calculando las frecuencias absolutas de tipo de desarrollo bacteriano en cada una de las categorías de estatus uterino (NOR y con ES).

### **Marco bioético del uso de animales**

Este experimento se realizó respetando las mismas consideraciones bioéticas que en el Capítulo II.

## **RESULTADOS**

### **Cultivos vaginales**

En la vagina de las perras con endometrio NOR se aislaron *Streptococcus*  $\beta$ -hemolítico, *Staphylococcus* spp., *Escherichia coli*, *Proteus*, bacilos BGNNF y *Corinebacterium* spp. En una de las perras no hubo aislamiento en vagina. En la vagina de las perras con ES se aislaron *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Escherichia coli*, BGNNF y *Proteus*. En 7 de las perras no hubo aislamiento en vagina. *Streptococcus* spp., *Escherichia coli* y *Staphylococcus* spp., fueron las bacterias más frecuentemente aisladas en la vagina de perras con endometrio NOR y con ES (Tablas 3.1. y 3. 2).

Tabla 3. 1. Bacterias aisladas de cultivos vaginales de perras con endometrio NOR y perras con ES.

Bacterias	NOR	ESA	ESSA	ESC	TP
<i>Streptococcus</i> $\beta$ -hemolítico	6	3	-	2	11
<i>Escherichia coli</i>	4	2	1	3	10
<i>Staphylococcus</i> spp.	2	2	1	1	6
BGNNF	1	1	1	-	3
<i>Proteus</i>	1	1	-	1	3
<i>Corynebacterium</i> spp.	1	-	-	-	1

NOR: normal; ESA: endometritis subclínica aguda; ESSA: endometritis subclínica subaguda; ESC: endometritis subclínica crónica; TP: total de perras; BGNNF: bacilos gram negativos no fermentadores.

Tabla 3. 2. Porcentaje de bacterias aisladas de cultivos vaginales.

<b>Bacterias</b>	<b>Porcentaje de muestras</b>
<i>Streptococcus</i> $\beta$ -hemolítico	31.42% (11/35)
<i>Escherichia coli</i>	28,57% (10/35)
<i>Staphylococcus</i> spp.	17.14% (6/35)
BGNF	8.57% (3/35)
<i>Proteus</i> spp.	8.57% (3/35)
<i>Corynebacterium</i> spp.	2.85% (1/35)

BGNF: bacilos gram negativos no fermentadores.

#### *Cultivos uterinos*

No se observó crecimiento bacteriano en ninguna de las muestras de úteros clasificados como NOR mediante BU. De los 20 cultivos que se realizaron a partir de endometrios clasificados como ES por BU (4 ESA, 7 ESSA, 9 ESC) se aislaron bacterias en sólo 4 muestras (2 ESA, 1 ESSA y 1 ESC). A partir de las muestras provenientes de endometrios con ESA se aisló *Escherichia coli* en una muestra y *Staphylococcus pseudointermedius* en otra. A partir de la muestra proveniente del endometrio con ESSA se aislaron *Corynebacterium* spp. y *Streptococcus*  $\beta$ -hemolítico. A partir de la muestra proveniente del endometrio con ESC se aisló *Streptococcus*  $\beta$ -hemolítico.

En las 2 perras con ESA se aisló la misma bacteria en el útero y en la vagina. En las perras con ESSA y ESC la bacteria aislada del útero fue diferente a las aisladas de vagina.

## DISCUSIÓN

Los hallazgos de la microbiota vaginal en nuestro trabajo fueron similares a los hallazgos informados por otros autores (Watts y col., 1996; Carneiro y col., 2005; Laurusevicius y col., 2008; Groppetti y col., 2012; Guerrero y col., 2018). En nuestro trabajo, *Streptococcus* spp., *Staphylococcus* spp., y *Escherichia coli*



fueron las bacterias más frecuentemente aisladas de la vagina, coincidiendo con otros autores (Watts y col., 1996; Carneiro y col., 2005; Groppetti y col., 2012; Guerrero y col., 2018). Nuestros hallazgos concuerdan con datos publicados anteriormente en los que se informa que *Streptococcus*  $\beta$ -hemolítico es una de las bacterias más frecuentemente aisladas de la vagina de perras preñadas y no preñadas clínicamente sanas así como de perras infértiles con flujo vaginal (Allen y Dagnall, 1982; Guerrero y col., 2018).

Por otra parte, en nuestro estudio no se aislaron bacterias del endometrio NOR. En las perras con ES, la mayoría de las muestras uterinas mostraron cultivos bacterianos negativos, coincidiendo con los trabajos publicados en vacas. Una posible explicación podría ser que para el momento en que se diagnosticó ES, las bacterias ya podrían haber sido eliminadas del útero por los mecanismos de defensa del huésped. Otra explicación podría ser que para la realización de nuestro estudio se utilizaron métodos de cultivos tradicionales en lugar de utilizarse métodos más sofisticados independientes del cultivo (Rondon y col., 2000; Santos y col., 2011). Es posible que en las perras con ES las bacterias permanecieran ocultas tal vez por desarrollo de biofilm, lo cual aumentaría el número de muestras uterinas sin aislamiento bacteriano a pesar de encontrarse bacterias en el endometrio. En este sentido, en los últimos años se ha logrado cierto progreso en vacas mediante el uso de métodos independientes del cultivo para estudiar los factores de virulencia de las bacterias en vacas con metritis y endometritis (Silva y col., 2009; Bicalho y col., 2010; Sheldon y col., 2010; Bicalho y col., 2012; Santos y Bicalho, 2012). En contraste con nuestros resultados y con los hallazgos obtenidos en trabajos realizados en vacas, en yeguas se aislaron frecuentemente

bacterias del útero de hembras con ES (Nielsen, 2005; Interian y col., 2014; Sikora y col., 2016). Sin embargo, debe considerarse que en las yeguas, la sensibilidad de las muestras bacteriológicas obtenidas de BU fue superior a la de las muestras obtenidas mediante hisopo (Nielsen, 2005). De la misma manera Sikora y col. encontraron que la sensibilidad de los cultivos obtenidos mediante lavaje uterino fue menor que la de los cultivos obtenidos mediante hisopos (Sikora y col., 2016). De esta forma, algunos de los resultados negativos en nuestro trabajo podrían estar relacionados con el método utilizado para obtener las muestras bacteriológicas. En un estudio previo realizado por Fontaine y col. en perras con endometritis, el 70% (7/10) mostraron crecimiento bacteriano dentro del útero. Las bacterias encontradas en esas perras fueron *Pasteurella multocida*, *Streptococcus* G del grupo G, *Staphylococcus intermedius*, *Escherichia coli* y *Proteus mirabilis* (Fontaine y col., 2009). En contraposición, en nuestro estudio la ES pareciera no tener un origen bacteriano en la mayoría de los casos. Las diferencias podrían deberse a que Fontaine y col. observaron en el 40% (4/10) de las perras que padecían endometritis, una descarga cervical mediante endoscopia vaginal. Además, en el mismo estudio, observaron inflamación cervical en el 30% (3/10) de las perras que padecían endometritis de origen bacteriano y signos de vaginitis en una de las perras (Fontaine y col., 2009). En contraposición, en el presente estudio no se observó descarga cervical ni signos de vaginitis asociados a endometritis. Concordando con los hallazgos informados por Gunay y col., en nuestro estudio no se observó crecimiento bacteriano en las muestras obtenidas de endometrio NOR (Gunay y col., 2010). De la misma manera, Watts y col. no

aislaron bacterias del útero de perras sanas, libres de enfermedad uterina (Watts y col., 1996).

### **CONCLUSIÓN**

Al no observarse asociación entre desarrollo de ES y aislamiento bacteriano, la bacteriología realizada mediante los métodos de cultivo tradicionales no sería una herramienta útil para el diagnóstico de ES. La realización de métodos de cultivo más sofisticados podría ser una opción para esclarecer el rol bacteriano en el desarrollo de ES en la especie canina.

## **CAPITULO IV**

### **EVALUACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA C REACTIVA EN PERRAS CON Y SIN ENDOMETRITIS SUBCLÍNICA**

#### **INTRODUCCIÓN**

La proteína C reactiva es una PFAs que aumenta sus concentraciones sanguíneas como respuesta a un proceso inflamatorio, por lo cual se denomina proteína de fase aguda positiva (Martínez-Subiela y col., 2004). La respuesta de fase aguda es una respuesta inespecífica y puede desencadenarse por diversas causas como procesos infecciosos, desórdenes inmunológicos, procesos neoplásicos o traumatismos (Kushner y Mackiewicz 1987; Stadnyk y Gauldie 1991). Las PFAs actúan ante el daño generado restaurando la homeostasis, por lo cual son consideradas marcadores útiles de la inflamación. Es así que, las PFAs son utilizadas tanto para el diagnóstico y pronóstico de enfermedades como así también, para el monitoreo de la respuesta a diferentes tratamientos instaurados en los pacientes (Martínez-Subiela y col., 2004; Martínez-Subiela y Cerón, 2005).

La proteína C reactiva es sintetizada en el hígado a través de los hepatocitos y regulada por citoquinas proinflamatorias que se liberan en el sitio de injuria, tales como TNF- $\alpha$  e IL-6. (Aziz y col., 2003; Petersen y col., 2004). La proteína C reactiva actúa mediante activación del complemento y opsonización bacteriana, modulación de monocitos, macrófagos y producción de citoquinas, unión a cromatina bacteriana y acción sobre la migración tisular de neutrófilos. (Petersen y col., 2004). La concentración sérica de proteína C reactiva se puede

determinar utilizando pruebas como ELISA, aglutinación rápida en látex, inmunodifusión, electroinmunoensayo y ensayo inmunoturbidimétrico (Hayashi y col., 2001; Kjelgaard- Hansen y col., 2003; Saavedra y col., 2009). En la especie canina, se ha demostrado su comportamiento como reactante de fase aguda y, además, se ha demostrado su reacción cruzada con la proteína C reactiva humana por medio de la prueba de aglutinación en látex (Caspi y col., 1987). En medicina humana, la proteína C reactiva ha sido considerada como un biomarcador utilizado para el diagnóstico y/o pronóstico de procesos infecciosos, inflamatorios o trauma (Smith y Lipworth, 1995, Pova y col., 2011; Shrotriya y col., 2015). En medicina veterinaria, la proteína C reactiva ha sido también utilizada como indicador de inflamación y para el seguimiento de la respuesta a diferentes tratamientos en diversas enfermedades (Eckersall, 1995; Bigoszewski y col., 2001; Fransson y col., 2004; Dabrowski y col., 2007). Asimismo, se han observado altas concentraciones de proteína C reactiva en perras preñadas coincidiendo con el momento de la implantación embrionaria (Eckersall y col., 1993). En la especie canina, las PFAs prometen ser de gran utilidad para evaluar el estado de salud de los animales, habiéndose afirmado incluso que en el futuro serán incluidas como un parámetro de rutina en los perfiles bioquímicos que se realicen a los animales (Eckersall y col., 2001). Karlson y col. han realizado un trabajo en el cual comunicaron altas concentraciones de proteína C reactiva en perras con piometra, siendo superiores las concentraciones de esta proteína en hembras con un estadio más avanzado de piometra, las cuales presentaban sepsis (Karlson y col., 2012). Asimismo, se han comparado las concentraciones de proteína C reactiva en perras con HEQ/mucometra y perras sanas sin observarse

diferencias significativas (Enginler y col., 2014). Es por este hecho que se ha diseñado un experimento con el fin de comparar las concentraciones séricas de proteína C reactiva en perras con endometrio NOR y en perras con ES y de este modo determinar la utilidad de la proteína C reactiva como herramienta de aproximación diagnóstica de ES.

### **OBJETIVO**

Evaluar la concentración sérica de proteína C reactiva en perras con y sin ES.

### **HIPÓTESIS**

La concentración sérica de proteína C reactiva en perras con ES será mayor que en perras sin ES.

### **MATERIALES Y METODOS**

#### ***Diseño experimental***

Se seleccionaron 38 perras clínicamente sanas, mestizas, de entre 8 meses y 6 años, con un peso entre 10 y 30 Kg, pospúberes, de ciclos estrales regulares, en diestro. Las perras seleccionadas no habían recibido tratamiento anticonceptivo previo a la toma de muestra. Las perras seleccionadas formaron parte de un plan de control urbano de la reproducción realizado en un centro municipal (Centro de Zoonosis, Municipalidad de La Plata, Buenos Aires, Argentina). Cada una de ellas asistió al centro municipal para realizar la ovariectomía.

#### ***Procesamiento y toma de muestras***

A cada una de las perras se le realizó un examen clínico general y se le tomó una muestra para estudio citológico vaginal y una muestra de sangre para posterior medición de P<sub>4</sub> sérica. El momento del ciclo se determinó en base a la fecha del último celo relatada por el propietario, la citología vaginal, la presencia o no de CL en los ovarios y la concentración de P<sub>4</sub> sérica. Luego de la ovariectomía, los úteros y los ovarios de las perras fueron remitidos al Laboratorio de Reproducción Animal de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata para su estudio. Cada útero con sus correspondientes ovarios fueron examinados. Se observaron los ovarios y se registró la presencia de CL. Se tomó una muestra de cada cuerno uterino mediante punch de 0,4 cm de diámetro para su estudio histopatológico (Madoz, 2011; Schlafer, 2012).

En todas las perras se obtuvo una muestra de sangre sin anticoagulante. Las muestras de sangre obtenidas fueron centrifugadas y el suero almacenado a -20°C hasta la determinación de las concentraciones de proteína C reactiva y de P<sub>4</sub>. La concentración de proteína C reactiva se midió mediante el kit de aglutinación de látex (aglutinación de látex, C-Reactive Protein®, BioSystems, Barcelona, España, concentración mínima detectada 6 mg/l; Caspi y col., 1987; Figura 4. 1). Las mediciones de las concentraciones séricas de P<sub>4</sub> se realizaron como se describió en el capítulo II de la presente tesis.

En base al resultado obtenido a partir de la BU, las perras fueron divididas en dos grupos, Grupo I hembras con ES (n=22) y Grupo II hembras con endometrio NOR (n=16).

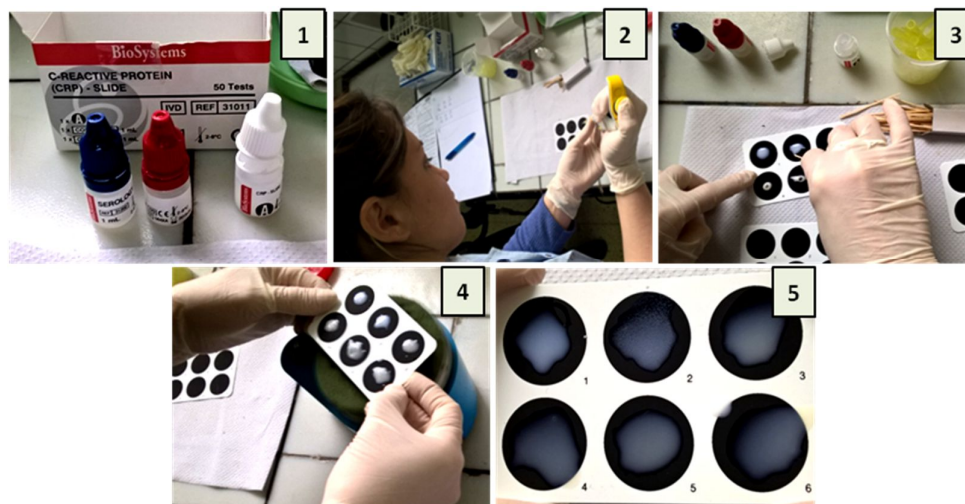


Figura 4. 1. Procesamiento de las muestras proteína C reactiva en el laboratorio  
1) Kit de proteína C reactiva; 2) Colocación de las muestras y los controles positivo y negativo en los pocillos; 3) Mezcla del suero con los reactivos mediante palillo; 4) Agitación de las muestras para la reacción; 5) Observación de aglutinación, pocillo 2: control positivo.

### ***Análisis estadístico***

Para el análisis de datos se realizó la prueba de Van der Waerden mediante el paquete estadístico SAS 9.4. El nivel de significancia establecido fue  $P < 0,05$  y la tendencia  $P < 0,10$ .

### ***Marco bioético del uso de animales***

Este experimento se realizó respetando las mismas consideraciones bioéticas que en el Capítulo II.

## **RESULTADOS**

La frecuencia de proteína C reactiva fue más alta en perras con ES (6/22, 27%) frente a perras con endometrio NOR (0/16, 0%, valor P de Van der Waerden = 0,0302).



## DISCUSIÓN

El objetivo de este experimento fue evaluar la concentración sérica de proteína C reactiva en perras con ES y en perras con endometrio NOR con el fin de utilizar a la proteína C reactiva como una herramienta de aproximación diagnóstica para la ES. En nuestro estudio, si bien el porcentaje de muestras positivas (con presencia de aglutinación) en las perras con ES ( $6/22=27\%$ ) fue diferente al porcentaje de muestras positivas en perras con útero normal ( $0/16=0\%$ ) no pudimos adjudicar el aumento de proteína C reactiva en esas perras a la ES. El número de perras con ES y con proteína C reactiva positiva no permitió realizar una curva Rock, por lo cual, obtener el valor predictivo no fue posible. Los resultados obtenidos en nuestro experimento muestran que la proteína C reactiva no sería una herramienta útil para la aproximación diagnóstica de ES en perras, ya que muchas de las muestras de perras con ES fueron negativas (no aglutinaron) a la prueba. Nuestros resultados se contraponen con un trabajo realizado por Kaya y col. en vacas con endometritis, quienes observaron que algunas PFAs (ceruloplasmina, amiloide A sérico, haptoglobina) aumentaban significativamente en las vacas con endometritis comparado con las vacas sanas (Kaya y col., 2016). Estas discrepancias podrían deberse a que Kaya y col. estudiaron vacas con endometritis clínica mientras que nosotros trabajamos con perras con ES. Asimismo, se han realizado trabajos en perras en los cuales se informaron concentraciones séricas de proteína C reactiva significativamente más altas en el grupo piometra en comparación con el grupo control NOR (Enginler y col., 2014; Jitpean y col., 2014). Nuevamente, las diferencias entre nuestros resultados y los resultados de Jitpean y col., y Enginler y col., podrían deberse a

que los mencionados autores trabajaron con hembras con enfermedad clínica y sistémica. En relación a estudios sobre afecciones uterinas sin compromiso sistémico pudo observarse que al comparar el grupo HEQ/mucómetra con el grupo control NOR, Enginler y col., no observaron diferencias significativas en la concentración de proteína C reactiva (Enginler y col., 2014). Resultados similares se obtuvieron en este experimento al comparar perras con ES y perras con endometrio NOR. Esto podría deberse a que la ES, la HEQ y la mucómetra son afecciones subclínicas y/o con un bajo grado de inflamación, tal vez insuficiente para aumentar significativamente los niveles de proteína C reactiva. La diferente concentración sérica de proteína C reactiva en perras con diferente condición uterina podría deberse a que la proteína C reactiva sea un buen marcador diagnóstico/pronóstico de afecciones clínicas como la piometra y/u otras enfermedades que conducen a inflamación sistémica o afecciones locales del endometrio de cierta cuantía, pero no así, para afecciones uterinas sin inflamación sistémica o con bajo grado de inflamación local. Resultados previos en relación a la elevación sérica de proteína C reactiva durante la implantación en la perra podrían apoyar la hipótesis de la necesidad de cierto grado de inflamación en el útero para inducir elevación de proteína C reactiva (Eckersall y col., 1993). Asimismo, trabajos previos han demostrado que las PFAs aumentan a medida que la endometritis es más severa (Kaya y col., 2016).

Por otra parte, nuestros resultados concuerdan con Sikora y col., quienes en un trabajo realizado en yeguas no pudieron demostrar la utilidad de la haptoglobina y el amiloide sérico A en el diagnóstico de ES y al igual que nosotros, ellos hipotetizaron que las pocas yeguas con ES que presentaban altas

concentraciones de PFAs podrían estar padeciendo otra enfermedad (Sikora y col., 2016). En contraposición con nuestros resultados y con los resultados de Sikora y col., Brodzki y col. en un estudio realizado en vacas observaron concentraciones de haptoglobina y amiloide sérico A significativamente más altas en vacas con ES comparado con vacas sanas (Brodzki y col., 2015). Estas diferencias podrían deberse a las diferencias entre especies, al método utilizado para medir concentraciones de PFAs, a las diferentes PFAs utilizadas en los diferentes trabajos y/o al momento en que se toma la muestra.

### **CONCLUSIÓN**

La determinación de la concentración de proteína C reactiva como herramienta de aproximación diagnóstica para ES en caninos no pudo ser demostrada de manera concluyente en nuestro estudio. Futuros estudios que incluyan un mayor número de animales podrían ser útiles para realizar una curva Rock y completar este estudio.

## **CAPITULO V**

### **MORFOMETRÍA ENDOMETRIAL EN DIFERENTES ETAPAS DEL DIESTRO CANINO**

#### **INTRODUCCIÓN**

En la perra vacía, luego de la fase folicular ocurre una fase luteal muy prolongada. Esto es debido a que el CL perdura durante más de dos meses produciendo altas concentraciones de P<sub>4</sub> sérica por más tiempo que lo que ocurre en la hembra gestante. Este proceso fisiológico sucede debido a que no existe un mecanismo luteolítico en la especie (Johnston y col., 2001; Feldman y col., 2007). Las variaciones en las concentraciones séricas de E<sub>2</sub> o P<sub>4</sub>, asociadas a la fase folicular o luteal, producen cambios histomorfológicos en el endometrio canino (Johnston y col., 2001; Galabova y col., 2003). El extenso diestro canino puede dividirse 3 etapas: DTE, DME y DTA. En cada una de estas etapas, el endometrio se encuentra expuesto a diferentes concentraciones de P<sub>4</sub> en relación con la edad y funcionalidad del CL, presentando diferencias morfológicas (Galabova 2003; Stornelli y col., 2018). Es así que, las altas concentraciones de P<sub>4</sub> sérica presentes durante el diestro actúan sobre el endometrio promoviendo el crecimiento y la secreción de las glándulas endometriales y suprimiendo la actividad miometrial. Este hecho lleva a la acumulación de secreción glandular en el útero y predispone a afecciones endometriales que comprometen la fertilidad interfiriendo con la implantación o desarrollo embrionario (Johnston y col., 2001; Feldman y col., 2007). Es conocido que la salud uterina es uno de los pilares de la fertilidad en la

hembra. Un útero sano con un endometrio íntegro es fundamental para la obtención de altas tasas de preñez y tamaños de camada aceptables. En este contexto un útero conservado histomorfológicamente se relaciona con buenas tasas de fertilidad (Johnston y col., 2001).

La morfometría permite, mediante un análisis cuantitativo, evaluar objetivamente las variaciones de la morfología celular. Ya en 1987, Baak comunicó la importancia del examen patológico cuantitativo de células y tejidos para proporcionar información diagnóstica y pronóstica importante (Baak y col., 1987). Si bien existen diversos estudios sobre morfometría de diferentes tejidos, son escasos los trabajos sobre morfometría uterina en hembras caninas (Rodrigues Monteiro y col., 2009; Gropetti y col., 2010; Ramos y col., 2015; Salinas y col., 2017). Es así que el estudio morfométrico del útero normal de perras en diferentes etapas del diestro podría aportar datos interesantes en relación a las modificaciones ocurridas en el endometrio durante esta etapa del ciclo estral. Asimismo, comparar mediante un análisis morfométrico el endometrio canino NOR y con ES, podría aportar datos interesantes para el diagnóstico de ES en la perra.

Para estudiar la morfometría uterina se realizaron dos experimentos con el fin de evaluar los cambios morfométricos sufridos en el endometrio durante el diestro, así como también, la presencia o ausencia de variaciones ocurridas en endometrios NOR y con ES durante el diestro.

## **EXPERIMENTO I**

### **OBJETIVO**

Realizar un estudio morfométrico del endometrio canino normal en las diferentes etapas del diestro.

### **HIPÓTESIS**

La altura de las CG endometriales y el GE varían con la etapa del diestro.

### **MATERIALES Y MÉTODOS**

#### ***Diseño experimental***

Se estudió el endometrio de 14 perras clínicamente sanas, mestizas, de entre 8 meses y 5 años, con un peso entre 10 y 30 Kg, pospúberes, de ciclos estrales regulares, en diestro, que no habían recibido anticonceptivos. Las perras seleccionadas formaron parte de un plan de control urbano de la reproducción realizado en un centro municipal (Centro de Zoonosis, Municipalidad de La Plata, Buenos Aires, Argentina). Cada una de ellas asistió al centro municipal para ser sometidas a ovariectomía.

Las perras fueron divididas en 3 grupos (G) según la etapa del diestro, G1: perras en DTE (hasta 20 días post-celo; n=4), G2: perras en DME (entre 21 y 40 días post-celo; n=4), G3: perras en DTA (más de 41 días post-celo; n=6). La etapa del diestro se determinó en base a los datos obtenidos de la anamnesis realizada a

los propietarios de las perras (fecha del último celo) y la determinación de P<sub>4</sub> sérica.

### ***Toma de muestras***

A cada una de las perras se les tomó una muestra de sangre, sin anticoagulante para determinación de P<sub>4</sub> sérica y una biopsia de cada cuerno uterino. Luego de la extracción, las muestras de sangre fueron centrifugadas y el suero almacenado a -20°C hasta ser procesadas. Las mediciones de P<sub>4</sub> fueron realizadas mediante quimioluminiscencia (Elecsys®, Progesterone II; Roche, Mannheim, Germany). El coeficiente de variación intraensayo para el pool alto (4,87 ng/ml) y para el pool bajo (0,3ng/ml) fue 4,5% y 2% respectivamente.

Las BU se realizaron tomando una muestra de 1 x 1 cm que comprendió toda la pared del órgano. Las muestras fueron fijadas en solución formolada tamponada al 10% para posteriormente, ser deshidratadas, incluidas en parafina, y procesadas con técnicas convencionales de H&E. Las muestras fueron evaluadas al MO para confirmar la ausencia de afecciones endometriales. Se consideraron normales aquellos endometrios con pliegues longitudinales de mucosa, epitelio endometrial superficial intacto, tejido conjuntivo formando la lámina propia con glándulas endometriales de estructura conservada, tal como se describió en el Capítulo II de la presente tesis.

Para el estudio morfométrico se capturaron imágenes utilizando un MO Nikon Eclipse 50i conectado a una cámara Nikon DS-Fi2. En cada una de las muestras se realizaron 10 mediciones del GE a 4X y se midió a 60X la altura de 10 CG por campo en 5 campos del endometrio elegidos al azar (Figura 5. 1). Para

realizar las mediciones se utilizó el programa de análisis de imágenes para histomorfometría Image J-Fiji 1.46.

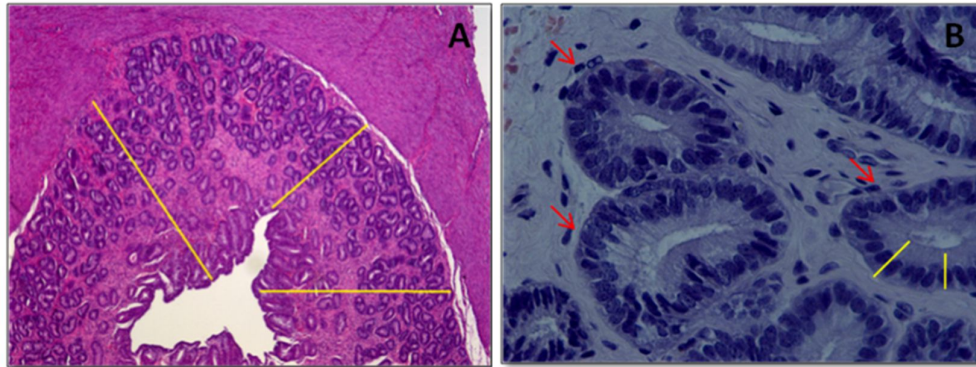


Figura 5. 1. Microfotografías de útero canino NOR en diestro. A) Mediciones del GE (líneas amarillas); Objetivo 4X H&E. B) Glándulas endometriales (flechas rojas). Mediciones de la altura de las CG (líneas amarillas). Objetivo 60X H&E.

## EXPERIMENTO II

### OBJETIVOS

Comparar la histomorfometría endometrial del diestro en perras con endometrio NOR y con ES.

Evaluar las muestras de ES en las diferentes etapas del diestro.

### HIPÓTESIS

La histomorfometría endometrial del diestro en perras con endometrio NOR y con ES es diferente.

La altura de las CG endometriales y el GE varían con la etapa del diestro.



## MATERIALES Y MÉTODOS

### *Diseño experimental*

Se estudiaron cortes histológicos del endometrio de 45 perras clínicamente sanas, mestizas, de entre 8 meses y 5 años, con un peso entre 10 y 30 Kg, pospúberes, de ciclos estrales regulares, en diestro, que no habían recibido anticonceptivos. Las perras seleccionadas formaron parte de un plan de control urbano de la reproducción realizado en un centro municipal (Centro de Zoonosis, Municipalidad de La Plata, Buenos Aires, Argentina). Cada una de ellas asistió al centro municipal para ser sometidas a ovariohisterectomía. El diestro se determinó en base a los datos obtenidos de la anamnesis realizada a los propietarios de las perras (fecha del último celo) y la determinación de P<sub>4</sub> sérica.

### *Toma de muestras*

A cada una de las perras se les tomó una muestra de sangre, sin anticoagulante para determinación de P<sub>4</sub> sérica y una biopsia de cada cuerno uterino. Luego de la extracción, las muestras de sangre fueron centrifugadas y el suero almacenado a -20°C hasta ser procesadas. Las mediciones de P<sub>4</sub> fueron realizadas mediante quimioluminiscencia (Elecsys®, Progesterone II; Roche, Mannheim, Germany). El coeficiente de variación intraensayo para el pool alto (4,87 ng/ml) y para el pool bajo (0,3ng/ml) fue 4,5% y 2% respectivamente.

Las BU se realizaron tomando una muestra de 1 x 1 cm que comprendió toda la pared del órgano. Las muestras fueron fijadas en solución formolada tamponada al 10% para posteriormente, ser deshidratadas, incluidas en parafina, y procesadas con técnicas convencionales de H&E. Las muestras fueron evaluadas al MO y clasificadas como se describió en el Capítulo II de la presente tesis

obteniéndose los siguientes grupos: NOR (n=14) y ES (n=31). Las muestras con ES según el curso de la inflamación fueron clasificadas como ESA: n=10; ESSA: n=7; ESC: n=14.

Para el estudio morfométrico se capturaron imágenes utilizando un MO Nikon Eclipse 50i conectado a una cámara Nikon DS-Fi2. En cada una de las muestras se realizaron 10 mediciones del GE a 4X y se midió a 60X la altura de 10 CG por campo en 5 campos del endometrio elegidos al azar, tal como se describió en el Experimento I del presente capítulo. Para realizar las mediciones se utilizó el programa de análisis de imágenes para histomorfometría Image J-Fiji 1.46.

## **EXPERIMENTOS I Y II**

### ***Análisis estadístico***

Se ajustaron modelos de regresión lineal con medidas repetidas en el espacio para evaluar el efecto de las categorías de diestro en la altura de las CG y en el GE de perras con endometrio NOR para el Experimento I.

Se ajustaron modelos de regresión lineal con medidas repetidas en el espacio para evaluar el efecto de las categorías endometriales (NOR o ES) sobre la altura de las CG y el GE y para evaluar el efecto de las categorías diestro en la altura de las CG y en el GE de endometrios con ES para el Experimento II (Proc GLIMMIX, SAS).

### ***Marco bioético del uso de animales***

Este experimento se realizó respetando las mismas consideraciones bioéticas que en el Capítulo II.

## **RESULTADOS**

### **EXPERIMENTO I**

Al comparar la altura de las CG del endometrio de las distintas etapas del diestro se observaron diferencias significativas entre DTE y DME y entre DME y DTA ( $18.29 \pm 1.22$  vs.  $14.44 \pm 1.22 \mu\text{m}$ ,  $P=0.02$ ;  $14.44 \pm 1.22$  vs.  $8.9 \pm 1 \mu\text{m}$ ,  $P=0.0005$ , respectivamente, Figura 5. 2). Sin embargo, no se observaron diferencias significativas al comparar el GE en las diferentes etapas del diestro (Figura 5. 3). Al analizar la concentración de  $P_4$  sérica en la distintas etapas del diestro se observaron diferencias significativas entre DTE vs. DME y DME vs. DTA ( $43.58 \pm 10.83$  vs.  $19.6 \pm 4.66$  ng/ml;  $19.6 \pm 4.66$  vs.  $2.61 \pm 1.26$  ng/ml;  $p < 0.05$ ; Figura 5. 4).

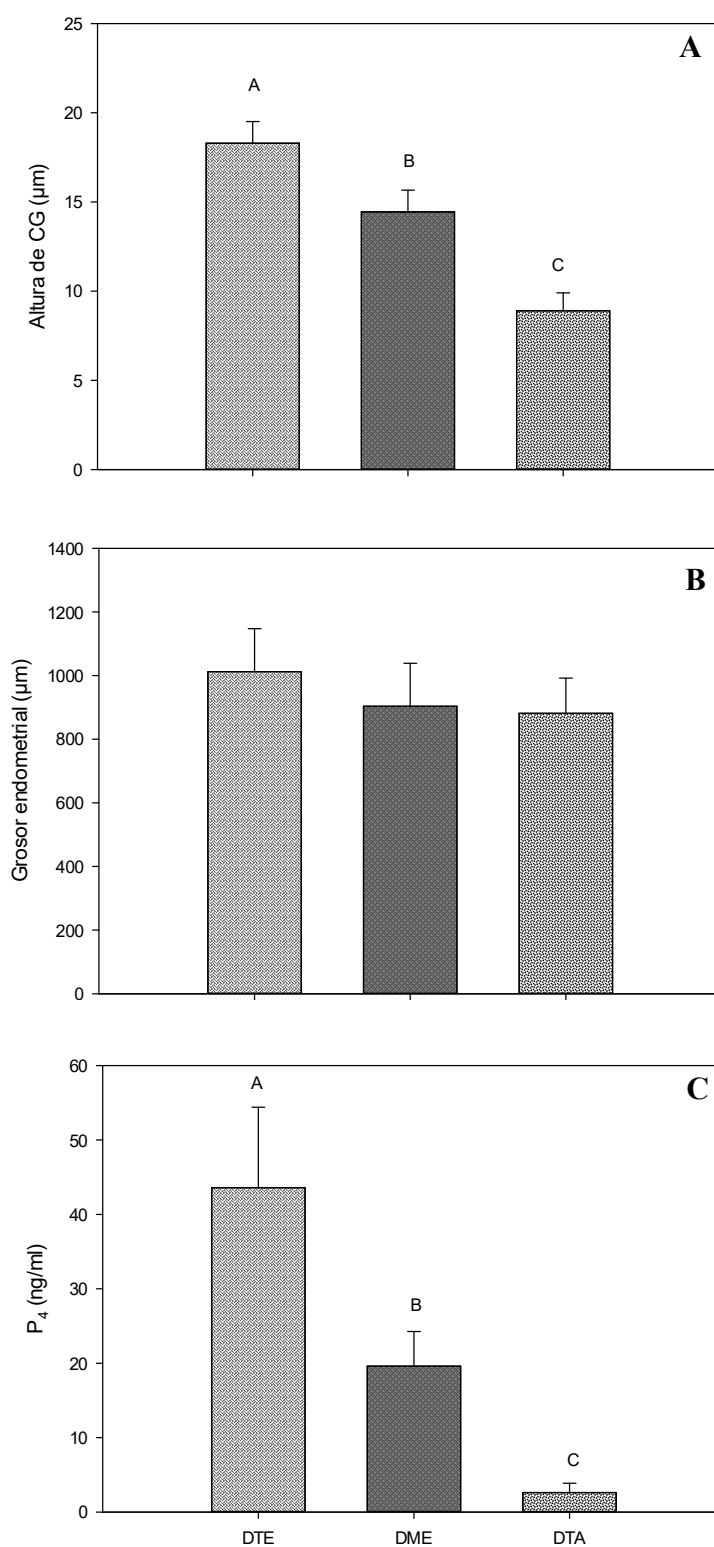


Figura 5. 2. Altura de las CG endometriales ( $\mu\text{m}$ ; A), grosor endometrial ( $\mu\text{m}$ ; B), y concentraciones de P<sub>4</sub> (ng/ml; C) en las diferentes etapas del diestro: DTE, DME, DTA, en perras con endometrio NOR (CMM  $\pm$  error estándar). Letras diferentes indican diferencias significativas,  $P \leq 0,05$ .

## EXPERIMENTO II

Al comparar la altura de las CG del endometrio con ES en las distintas etapas del diestro se observaron diferencias estadísticamente significativas entre DTE y DTA y entre DME y DTA ( $17.49 \pm 1.49$  vs.  $9.68 \pm 0.84 \mu\text{m}$ ,  $P < 0.0001$ ;  $15.25 \pm 1.16$  vs.  $9.68 \pm 0.84 \mu\text{m}$ ,  $P < 0.0001$ , respectivamente; Figura 5. 5). Al comparar el GE del endometrio con ES en las distintas etapas del diestro se observaron diferencias estadísticamente significativas entre DTE y DTA y entre DME y DTA ( $978.82 \pm 126.01$  vs.  $693.59 \pm 73.4 \mu\text{m}$ ,  $P = 0.0507$ ;  $1083.89 \pm 98.86$  vs.  $693.59 \pm 73.43 \mu\text{m}$ ,  $P = 0.0017$ , respectivamente; Figura 5. 6). Al analizar la concentración de  $P_4$  sérica en perras con ES en las distintas etapas del diestro se observaron diferencias significativas entre DTE vs. DTA y DME vs. DTA ( $21.68 \pm 4.38$  vs.  $2.84 \pm 2.44$  ng/ml,  $P = 0.0008$ ;  $21.09 \pm 3.26$  vs.  $2.84 \pm 2.44$  ng/ml,  $P = 0.0001$ , respectivamente; Figura 5. 7).

Al comparar la altura de las CG y el GE entre el endometrio NOR y con ES no se observaron diferencias significativas ( $13.17 \pm 1.32$  vs.  $12.62 \pm 0.89 \mu\text{m}$ ,  $P = 0.73$ ;  $930.75 \pm 81.87$  vs.  $846.84 \pm 57.78 \mu\text{m}$ ,  $P = 0.4$ ; respectivamente; Figuras 5. 8 y 5. 9).

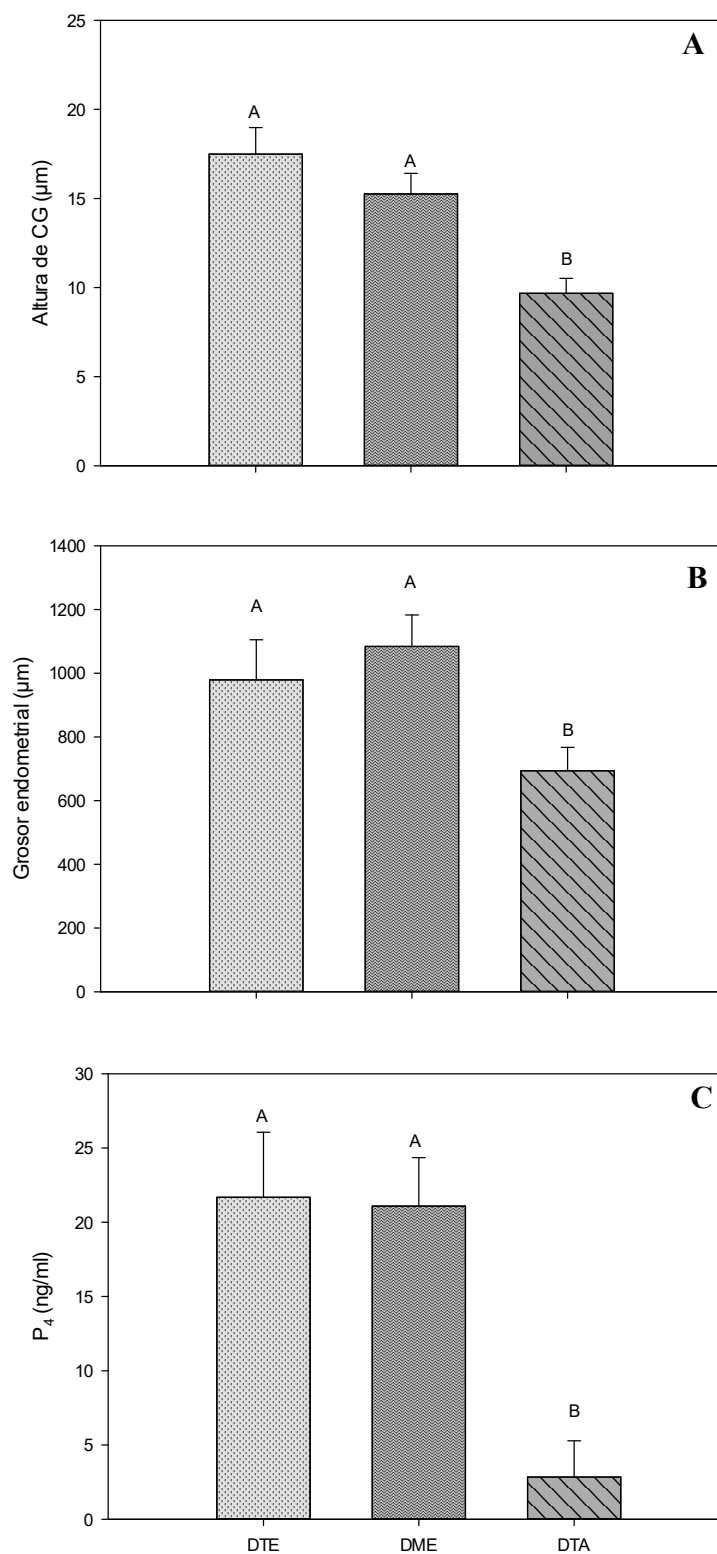


Figura 5. 3. Altura de las CG endometriales (µm; A), grosor endometrial (µm; B), y concentraciones de P<sub>4</sub> (ng/ml; C) en las diferentes etapas del diestro: DTE, DME, DTA, en perras con ES (CMM ±error estándar). Letras diferentes indican diferencias significativas, P≤0,05.

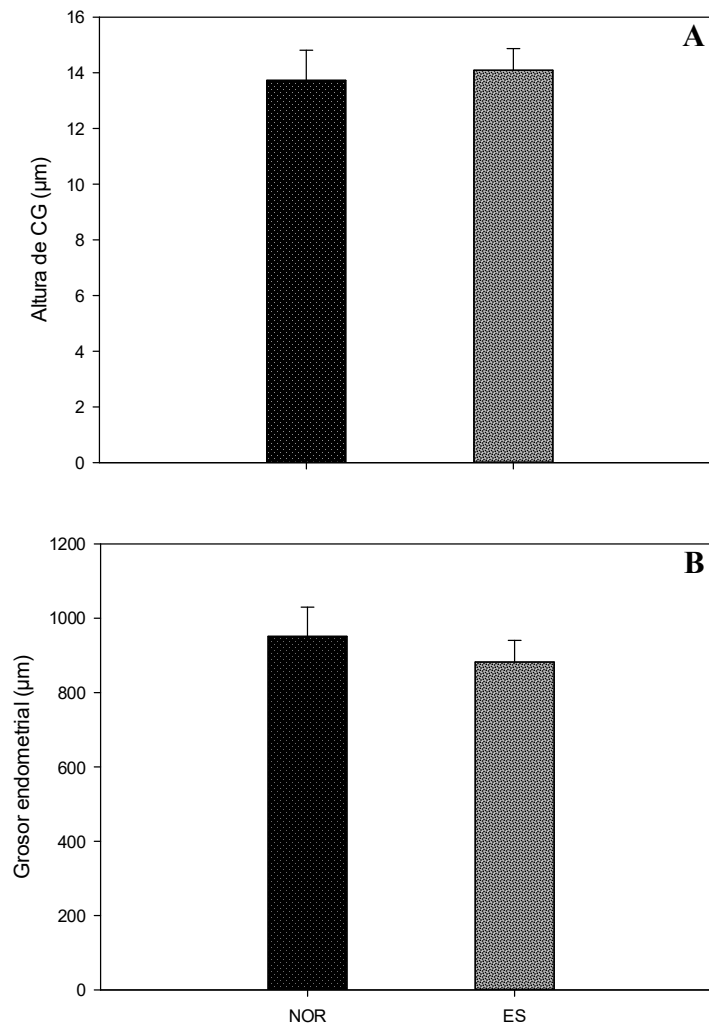


Figura 5. 4. Altura de las CG endometriales (μm; A) y grosor endometrial (μm; B) en perras con endometrio NOR y con ES (CMM ±ES). Letras diferentes indican diferencias significativas,  $P \leq 0,05$ .

## DISCUSIÓN

Se han comunicado escasos trabajos de morfometría endometrial en perras (Rodrigues Monteiro y col., 2009; Gropetti y col., 2010; Ramos y col., 2015; Salinas y col., 2017). Según nuestro conocimiento este es el primer trabajo en el cual se realizan estudios morfométricos del endometrio canino en perras con ES. En nuestro trabajo pudimos demostrar que la altura de las CG y la concentración sérica de  $P_4$  varían en las diferentes etapas del diestro en perras con endometrio

NOR y en perras con ES. Por el contrario, no observamos diferencias significativas en el GE en las diferentes etapas del diestro en perras con endometrio NOR. Sin embargo, observamos diferencias en el GE durante el diestro en perras con ES. Adicionalmente, pudimos observar concentraciones séricas de  $P_4$  más altas en perras con endometrio NOR respecto a las perras con ES.

En concordancia con los resultados obtenidos por Galabova y col., las concentraciones de  $P_4$  sérica varían con la etapa del diestro, siendo en DTE y DME superiores a las del DTA (Galabova y col., 2003). Asimismo, ambos estudios concuerdan con Stornelli y col., quienes comunicaron altas concentraciones de  $P_4$  sérica y un menor número de células apoptóticas en CL durante DTE en comparación con DME y DTA (Stornelli y col., 2018). Las concentraciones de  $P_4$  sérica en DTE y DME obtenidas en nuestro trabajo fueron superiores a las obtenidas por Galabova y col. en las mencionadas etapas del diestro (Galabova y col., 2003). Estas diferencias pueden deberse a que se realizaron diferentes métodos para determinar las concentraciones de  $P_4$  sérica. En nuestro trabajo se utilizó quimioluminiscencia mientras que en el trabajo comunicado por Galabova y col. se utilizó ELISA. Las concentraciones de  $P_4$  séricas registradas durante el diestro total en nuestro trabajo ( $16.71 \pm 1.5 \text{ ng/ml}$ ) fueron menores que las concentraciones de  $P_4$  sérica comunicadas por Gropetti y col. ( $49.4 \pm 24.8 \text{ ng/ml}$ ), y mayores que las comunicadas por Aydin y col. ( $9.92 \pm 0.89 \text{ ng/ml}$ ) durante el diestro. Las mencionadas variaciones en los registros de  $P_4$  pueden deberse a las diferencias individuales entre las perras estudiadas, y a las diferentes técnicas utilizadas para la determinación de  $P_4$  en los diferentes



trabajos (ELISA, ELFA, quimioluminiscencia). También debe considerarse que los autores mencionados, a diferencia de nosotros, no registraron la etapa del diestro en la que se encontraba la perra cuando se tomó la muestra. Sin embargo, las concentraciones de P<sub>4</sub> sérica registradas en nuestro estudio en DTE se encuentran dentro del rango de concentraciones de P<sub>4</sub> registradas por Gropetti y col. durante el diestro (Gropetti y col., 2010). Este hecho podría deberse a que en el mencionado estudio no se describe en qué etapa del diestro se tomaron las muestras y gran número de las perras estudiadas podrían haber estado en DTE al momento de la toma de muestra. Asimismo, en nuestro estudio observamos que en el endometrio NOR la altura de las CG es menor cuando las concentraciones séricas de P<sub>4</sub> disminuyen, mientras que el GE no varía. Estos resultados concuerdan con un trabajo realizado por Gossler y col. (Gossler y col. 2017).

Si bien Galabova y col., estudiaron BU de endometrios NOR obtenidas de perras en DTE, DME y DTA describiendo las características histológicas encontradas, no realizaron morfometría endometrial (Galabova y col., 2003). Se ha desarrollado un estudio en el cual se comparó el GE de perras nulíparas con el de perras multíparas que no habían recibido tratamiento anticonceptivo (Rodrigues Monteiro y col., 2009). En dicho trabajo, se observaron diferencias entre el GE de perras nulíparas y multíparas. El GE de perras multíparas comunicado por Rodrigues Monteiro y col., se encuentra dentro del rango del GE de las perras estudiadas en nuestro trabajo en todas las etapas del diestro (Rodrigues Monteiro y col., 2009). Asimismo, la altura de las CG endometriales de perras multíparas comunicada por dichos autores se encuentra dentro del rango de la altura de las CG del DME registrado en nuestro estudio (Rodrigues Monteiro

y col., 2009). Debe considerarse que en el trabajo previamente mencionado no se especifica la etapa del ciclo estral en la que se encontraban las perras y, además, se incluyeron perras prepúberes, mientras que nosotros sólo estudiamos una población de perras pospúberes (Rodrigues Monteiro y col., 2009). En un estudio realizado por Salinas y col., el GE de úteros NOR de perras nulíparas y multíparas fue mucho menor que el GE comunicado por Rodrigues Monteiro y col., y que los datos registrados en este estudio. Asimismo, Salinas y col., no observaron diferencias entre el GE de perras nulíparas y multíparas a diferencia de Rodrigues Monteiro y col. (Rodrigues Monteiro y col., 2009; Salinas y col., 2017). Las diferencias observadas pueden adjudicarse a que las perras estudiadas por Salinas y col., se encontraban en anestro cuando se tomó la muestra.

Existen escasos trabajos de análisis morfométricos realizados en el endometrio patológico (Gropetti y col., 2010) y según nuestro conocimiento ningún trabajo realizado en endometrio con ES. Gropetti y col., observaron diferencias en la CE y en la morfometría nuclear de muestras provenientes de perras con HEQ comparadas con perras con piometra (Gropetti y col., 2010). En nuestro trabajo no se observaron diferencias en la altura de las CG y el GE en el endometrio NOR en comparación con el endometrio con ES. Asimismo, hemos observado diferencias por el momento del diestro en las muestras con ES, coincidiendo con el Experimento I del presente capítulo en endometrio NOR. El número de perras correspondientes a los diferentes grupos (ESA-DTE, ESA-DME, ESA-DTA, ESSA-DTE, ESSA-DME, ESSA-DTA, ESC-DTE, ESC-DME, ESC-DTA) fue insuficiente para poder comparar el GE y la altura de las CG en cada una de las categorías (ESA, ESSA, ESC) por etapa de diestro. El estudio de

un mayor número de perras por grupo que permita comparar estas variables podría brindar datos importantes a la hora de implementar el diagnóstico de ES, pudiendo utilizarse a la morfometría uterina como una herramienta de aproximación diagnóstica de ES.

## **CONCLUSIONES**

Podríamos concluir que la altura de las CG endometriales y las concentraciones de P<sub>4</sub> varían en las diferentes etapas del diestro. El diagnóstico histopatológico se enriquecería mucho implementando una herramienta que permita obtener datos objetivos, como lo es la morfometría. Los datos morfométricos endometriales al igual que la descripción histológica del útero normal en diestro, aportan datos interesantes a la hora de diagnosticar enfermedades endometriales que comprometen la fertilidad de la perra. En especial, el completo conocimiento del endometrio normal durante el diestro es importante, ya que el diestro es la etapa del ciclo estral en la cual el endometrio se encuentra más expuesto a sufrir alteraciones. Esto es debido al estímulo de altas concentraciones de P<sub>4</sub> sostenido por largos periodos de tiempo, como consecuencia de un mecanismo luteolítico ausente en la perra no preñada.

## CONCLUSIONES GENERALES

Los resultados obtenidos en el presente trabajo de tesis muestran un alto porcentaje de ES en la perra, al igual que lo que ocurre en la yegua y en la vaca. Este hecho sugiere que las perras que cursen con infertilidad o subfertilidad de origen desconocido deberían ser sometidas a BU para estudiar su endometrio. En Capítulo II, al comparar la CE con la BU pudimos demostrar que la CE por la técnica de *cytobrush* no sería una herramienta de diagnóstico útil para la ES en la perra. En el Capítulo III pudimos concluir que no hay asociación entre la ES y desarrollo bacteriano mediante métodos de cultivo tradicionales, por lo cual la bacteriología no sería útil para diagnosticar ES. En el Capítulo IV pudimos concluir que la determinación de proteína C reactiva sérica no permitiría aproximar el diagnóstico de ES.

Por otra parte, en el Capítulo V pudimos demostrar el efecto del diestro en la altura de las CG, GE y concentraciones de P<sub>4</sub> sérica, lo cual indica la importancia de la etapa del diestro en la toma de muestra a la hora de diagnosticar ES. Asimismo, pudimos mostrar que una herramienta que otorgue información objetiva, como la morfometría es útil y necesaria en la aproximación diagnóstica de enfermedades subclínicas.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Acuña S, Fumuso E. Presencia y distribución de receptores esteroides y antígeno de proliferación celular en células del sistema inmune del endometrio equino. InVet. 2013; 15: 29-36.
2. Allen WE, Dagnall GJR. Some observations on the aerobic bacterial flora of the genital tract of the dog and bitch. J small Anim Pract. 1982; 23: 325-335.
3. Aughey E, Frye FL. Female reproductive system. En: Comparative veterinary histology. 2001. P. 189-191.
4. Aydin M, Dogan H, Timurkaan S. Changes in the histomorphology of the canine cervix, ovary and steroid hormone levels through the oestrous cycle. Res Opin Anim Vet Sci. 2013; 3: 343-347.
5. Aziz N, Fahey J, Detels R, Butch A. Analytical performance of a highly sensitive c-reactive protein-based immunoassay and the effects of laboratory variables on levels of protein in blood. Clin Diagn Lab Immunol. 2003; 10: 652-657.
6. Baak, JP. The principles and advances of quantitative pathology. Analytical and quantitative cytology and histology 1987; 9: 89-95.
7. Bain AM. The role of infection in infertility in the thoroughbred mare. Vet Rec. 1966; 78: 168-73.
8. Barrow G, Feltham RK, Cow N, Stell SS. Manual for identification of medical bacteria. 3rd. (Ed) Great Britain University. 1993; 50-150.
9. Bicalho ML, Machado VS, Oikonomou G, Gilbert RO, Bicalho RC. Association between virulence factors of *Escherichia coli*, *Fusobacterium necrophorum*, and *Arcanobacterium pyogenes* and uterine diseases of dairy cows. Vet Microbiol. 2012; 157: 125-131.
10. Bicalho RC, Machado VS, Bicalho ML, Gilbert RO, Teixeira AG, Caixeta LS, Pereira RV. Molecular and epidemiological characterization of bovine intrauterine *Escherichia coli*. J Dairy Sci. 2010; 93: 5818-5830.
11. Bigoszewski M, Ryuchlik A, Depta A. Acute phase proteins in domestic animals. Med Weter. 2001; 57: 151-5.
12. Bondurant RH. Inflammation in the bovine female reproductive tract. J Anim Sci. 1999; 77: 101-110.
13. Brodzki P, Kostro K, Krakowski L, Marczuk J. Inflammatory cytokine and acute phase protein concentrations in the peripheral blood and uterine washings of cows with subclinical endometritis in the late postpartum period. Vet Res Commun. 2015; 39: 143-149.
14. Carneiro A, Toniollo G, Schocken-Iturrino R. Avaliação microbiológica da flora vaginal e do corpo uterino de cadelas (*Canis familiaris*) submetidas a ovariossalpingohisterectomia. Ars veterinária. 2005; 21: 361-367.
15. Caspi D, Snel FWJJ, Batt Bennet D, Rutteman GR, Hartman EG, Baltz ML, Gruys E, Pepys MB. C reactive protein in dogs. Am J Vet Res. 1987; 48: 919-921.
16. Chapwanya A, Meade KG, Narciandi F, Stanley P, Mee JF, Doherty ML, Callanan JJ, O'Farrelly C. Endometrial biopsy: a valuable clinical and research tool in bovine reproduction. Theriogenology. 2010; 73: 988-994.

17. Christensen BW, Schlafer DH, Agnew DW, Wang C, Kozlowski C, Asa CS. Diagnostic value of transcervical endometrial biopsies in domestic dogs compared with full-thickness uterine sections. Reprod Domest Anim. 2012; 47: 342-46.
18. Cocchia N, Auletta L, Ucello V, Silvestro L, Mallardo K, Paraggio G, Pasolini MP. Comparison of the cytobrush, cottonswab and low-volume uterine flush techniques to evaluate endometrial cytology for diagnosing endometritis in chronically infertile mares. Theriogenology. 2012; 77: 89-98.
19. Concannon P, Hansel W, McEntee K. Changes in LH, Progesterone and Sexual Behavior Associated with Preovulatory Luteinization in the bitch. Biol Reprod. 1977; 17: 604-13.
20. Concannon P, Tsutsui T, Shille V. Embryo development, hormonal requirements and maternal responses during canine pregnancy. J Reprod Fertil. 2001; 57: 169-79.
21. Concannon PW, Hansel W, Visek WJ. The ovarian cycle of the bitch: plasma estrogen, LH and progesterone. Biol Reprod. 1975; 13:112-121.
22. Concannon PW. Biology of gonadotrophin secretion in adult and prepubertal female dogs. J Reprod Fert Suppl 1993; 47: 3-27.
23. Dabrowski R, Wawron W, Kostro K. Changes in CRP, SAA and haptoglobin produced in response to ovariohysterectomy in healthy bitches and those with pyometra. Theriogenology. 2007; 67: 321-7.
24. de Gier J, Kooistra HS, Djajadiningrat-Laanen SC, Dieleman SJ, Okkens AC. Temporal relations between plasma concentrations of luteinizing hormone, follicle-stimulating hormone, estradiol-17beta, progesterone, prolactin, and alpha-melanocyte-stimulating hormone during the follicular, ovulatory, and early luteal phase in the bitch. Theriogenology. 2006; 65: 1346-59.
25. DeBois C, Manspeaker J. Endometrial biopsy of the bovine. Current Therapy in Theriogenology, 2nd ed. Philadelphia, PA: WB Saunders Co; 1986.
26. Dhaliwal G, Murray R, Woldehiwet Z. Some aspects of immunology of the bovine uterus related to treatments for endometritis. Anim Reprod Sci. 2001; 67: 135-152.
27. Doig PA, McKnight JD, Miller RB. The use of endometrial biopsy in the infertile mare. Can Vet J. 1981; 22: 72-6.
28. Doig PA, Waelchli RO. Chapter 26, Endometrial biopsy. In: McKinnon AO, Voss L. Equine reproduction, USA: Ed Williams & Wilkins; 1993, p. 225-233.
29. Dow C. The cystic hyperplasia-pyometra complex in the bitch. Vet Rec. 1958; 70: 1102-10.
30. Eckersall PD, Harvey MJ, Ferguson JM, Renton JP, Nickson DA, Boyd JS. Acute phase proteins in canine pregnancy (Canis familiaris). J Reprod Fertil Suppl. 1993; 47: 159-64.
31. Eckersall PD, Young FJ, McComb C, Hogarth CJ, Safi S, Weber A, McDonald T, Nolan AM, Fitzpatrick JL. Acute phase proteins in serum and milk from dairy cows with clinical mastitis. Vet Rec. 2001; 148: 35-41.

32. Eckersall PD. Acute-phase proteins as markers of inflammatory lesions. Comp Haematol Int. 1995; 5: 93-7.
33. Enginler SO, Ates A, Diren Sığirer B, Sontas BH, Sonmez K, Karacam E, Ekici H, Evkuran Dal, Gurel A. Measurement of C-reactive protein and prostaglandin F2a metabolite concentrations in differentiation of canine pyometra and cystic endometrial hyperplasia/Mucometra. Reprod Dom Anim. 2014; 49: 641-647.
34. Feldman EC, Nelson RW. (2007). *Endocrinología y Reproducción canina y felina*. (3ra ed.). Buenos Aires, Argentina: Inter-Médica.
35. Fontaine E, Levy X, Grellet A, Luc A, Bernex F, Boulouis HJ, A Fontbonne. Diagnosis of endometritis in the bitch: a new approach. Reprod Dom Anim. 2009; 44: 196–199.
36. Fransson BA, Karlstam E, Bergstrom A, Lagerstedt AS, Park JS, Evans MA, Ragle CA. C reactive protein in the differentiation of pyometra from cystic endometrial hyperplasia/mucometra in dogs. J Am Anim Hosp Assoc. 2004; 40: 391-9.
37. Galabova G, Egerbacher M, Aurich JE, Leitner M, Walter I. Morphological changes of the endometrial epithelium in the bitch during metoestrus and anoestrus. Reprod Domest Anim. 2003; 38: 415-20.
38. Gifford AT, Scarlett JM, Schlafer DH. Histopathologic findings in uterine biopsy samples from subfertile bitches: 399 cases (1990-2005). J Am Vet Med Assoc. 2014; 244: 180-86.
39. Gilbert RO, Shin ST, Guard CL, Erb HN, Frajblat M. Prevalence of endometritis and its effects on reproductive performance of dairy cows. Theriogenology. 2005; 64: 1879-1888.
40. Gossler VA, Santos FAG, De azevedo AR, Gonçalves PC, Rigolo HA, Trevisan C, Masseno APB, Cardoso APMM, Papa PC, Castilho C, Giometti I. Evaluation of cell proliferation and endometrial thickness of bitches in different periods of diestrus. An Acad Bras Cienc. 2017; 89: 1719-1727.
41. Gropetti D, Pecile A, Arrighi S, Giancamillo Di, Cremonesi F. Endometrial cytology and computerized morphometric analysis of epithelial nuclei: A useful tool for reproductive diagnosis in the bitch. Theriogenology. 2010; 73: 927-941.
42. Gropetti D, Pecile A, Barbero C, Martino PA. Vaginal bacterial flora and cytology in proestrous bitches: role on fertility. Theriogenology. 2012; 77: 1549-56.
43. Grundy SA, Feldman E, Davidson A. Evaluation of infertility in the bitch. Clin Tech Small Anim Pract. 2002; 17: 108-15.
44. Guerrero AE, Stornelli MC, Jurado S, Giacoboni G, Swazza H, de la Sota RL, Stornelli MA. Vaginal isolation of beta-hemolytic Streptococcus from bitches with and without neonatal deaths in the litters. Reprod Dom Anim. 2018; 1: 1-8.
45. Gunay U, Onat K, Gunay A, Ulgen M. Vaginal, cervical and uterine bacterial flora at the different stages of the reproductive cycle in ovariectomized bitches. Journal of Animal and Veterinary Advances. 2010; 9(3): 478-481.

46. Gunnink J. Een Onderzoek naar het Afweermecanisme Van De Uterus, University of Utrecht, PhD Thesis: 1973, p. 143-160.
47. Hayashi S, Jinbo T, Iguchi K, Shimizu M, Shimada T, Nomura M, Ishida Y, Yamamoto S. A comparison of the concentrations of C- reactive Protein and  $\alpha$ 1-Acid Glycoprotein in the Serum of Young and Adult Dogs with Acute Inflammation. Vet Res Commun. 2001; 25: 117-126.
48. Hunt J, Miller L, Platt J. Hormonal Regulation of Uterine Macrophages. Dev Immunol. 1998; 6: 105-110.
49. Intan-Shamecha A, Zuki A, Noordin M, Wahid H, Azmi I. The effects of oestrogen and progesterone on lymphocyte and plasma cell population in the oviduct and uterine mucosae during follicular and luteal phases in ewes. Pertanika J Trop Agric Sci. 2011; 34: 181-187.
50. Interian L, Díaz N, Martínez J, Ortega V, Pérez JA, Márquez M. Diagnóstico y tratamiento de la endometritis subclínica en yeguas para ser incorporados a un programa de transferencia de embriones. Ciencia y Tecnología Ganadera. 2014; 8: 97-102.
51. Jitpean S, Ström Holst B, Höglund O, Pettersson A, Olsson U, Strage E, Södersten F, Hagman R. Serum Insulin-like growth factor-I, Iron, C-reactive protein and serum amyloid A for prediction of outcome in dogs with pyometra. Theriogenology. 2014; 82: 43-8.
52. Johnston SD, Root Kustritz MV, Olson PNS. (2001). *Canine and feline theriogenology*. (1st ed.). Philadelphia: W.B. Saunders Company.
53. Karlsson I, Hagman R, Johannisson A, Wang L, Karlstam E, Wernersson S. Cytokines as immunological markers for systemic inflammation in dogs with pyometra. Reprod Domest Anim. 2012; 47: 337-41.
54. Kasimanickam R, Duffield TF, Foster RA, Gartley CJ, Leslie KE, Walton JS, Johnson WH. A comparison of the cytobrush and uterine lavage techniques to evaluate endometrial cytology in clinically normal postpartum dairy cows. Can Vet J. 2005; 46: 255-259.
55. Kasimanickam R, Duffield TF, Foster RA, Gartley CJ, Leslie KE, Walton JS, Johnson WH. Endometrial cytology and ultrasonography for the detection of subclinical endometritis in postpartum dairy cows. Theriogenology. 2004; 62: 9-23.
56. Kastner P, Krust A, Turcotte B, Stropp U, Tora L, Gronemeyer H, Chambon P. Two distinct estrogen-regulated promoters generate transcripts encoding the two functionally different human progesterone receptor forms A and B. EMBO J. 1990; 9: 1603-14.
57. Kaya S, Merhan O, Kacar C, Colak A, Bozukluhan K. Determination of ceruloplasmin, some other acute phase proteins, and biochemical parameters in cows with endometritis. Vet World. 2016; 9: 1056-1062.
58. Kenney R, Doig P. Equine endometrial biopsy. In: Current therapy in Theriogenology. Morrow, D. 2nd edition. Philadelphia: Lea and Febiger; 1986, p. 723-29.
59. Kjelgaard-Hansen M, Kristensen AT, Jensen AL. Evaluation of a Commercially Available Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) for the Determination of C-Reactive Protein in Canine Serum. J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med. 2003; 50: 164-168.



60. Kushner I, Mackiewicz A. Acute phase proteins as a disease markers. Dis Markers. 1987; 5: 1-11.
61. Laurusevičius SA, Jūratė Š, Henrikas Ž. Correlation between different sexual cycle stages and vaginal bacterial flora in bitches of different breeds. Lithuanian Veterinary Academy. 2008; 41: 76-79.
62. LeBlanc MM, Causey RC. Clinical and subclinical endometritis in the mare: Both threats to fertility. Reprod Dom Anim. 2009; 44: 10-22.
63. LeBlanc MM. Advances in the diagnosis and treatment of chronic infectious and post-mating-induced endometritis in the mare. Reprod Domest Anim. 2010; 2: 21-7.
64. Madoz LV, Giuliadori MJ, Jaureguiberry M, Plöntzke J, Drillich M, de la Sota RL. The relationship between endometrial cytology during estrous cycle and cutoff points for the diagnosis of subclinical endometritis in grazing dairy cows. J Dairy Sci. 2013; 96: 4333-39.
65. Madoz LV, Giuliadori MJ, Migliorisi AL, Jaureguiberry M, de la Sota RL. Endometrial cytology, biopsy, and bacteriology for the diagnosis of subclinical endometritis in grazing dairy cows. J Dairy Sci. 2014; 97: 195-201.
66. Madoz V. Endometritis subclínica en vacas de tambo: diagnóstico, prevalencia e impacto sobre la eficiencia reproductiva. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata. 2011.
67. Mariño Fuentes B, Quintela Arias LA, Becerra JJ, del Barrio del Sol L, Mociños JE, Guillin JL, Barrio M, Prieto A, Diaz JM, Fernandez G, García PJ, Peña AI. Agreement between postmortem endometrial cytology, biopsy and bacteriology in culled dairy cows. Animal Reproduction. 2017; 14: 1024-33.
68. Martínez-Subiela S, Cerón JJ. Validación analítica de técnicas comerciales para la determinación de haptoglobina, proteína C reactiva y amiloide A sérico en caninos. Arch Med Vet. 2005; 37: 61-66.
69. Martínez-Subiela S, Parra ND, Cerón JJ. Principales aplicaciones de las proteínas de fase aguda en la clínica canina. An Vet Murcia. 2004; 20: 75-86.
70. McEntee K. The female genital system. Pathology of domestic animals. Academic Press, Orlando, FL; 1983, p. 305-407.
71. Mir F, Fontaine E, Albaric O, Greer m, Vannier F, Schlafer, DR, Fontbonne A. Findings in uterine biopsies obtained by laparotomy from bitches with unexplained infertility or pregnancy loss: An observational study. Theriogenology. 2013; 79: 312-322.
72. National Research Council. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. 8<sup>th</sup> Edition. USA, Washington DC. Ed The National Academies Press, 2010.
73. Nielsen JM. Endometritis in the mare: a diagnostic study comparing cultures from swab and biopsy. Theriogenology. 2005; 64: 510.
74. Olson PN, Mather EC. Canine vaginal and uterine bacterial flora. J Am Vet Med Assoc. 1978; 172: 708-11.

75. Overbeck W, Jäger K, Schoon HA, Witte TS. Comparison of cytological and histological examinations in different locations of the equine uterus in vitro study. Theriogenology. 2013; 79:1262-1268.
76. Overbeck W, Witte TS, Heuwieser S. Comparison of three diagnostic methods to identify subclinical endometritis in mares. Theriogenology. 2011; 75: 1311-1318.
77. Petersen H, Nielsen J, Heegaard P. Application of acute phase protein measurements in veterinary clinical chemistry. Vet Res. 2004; 35: 163-187.
78. Plontzke J, Madoz LV, De la Sota RL, Drillich M, Heuwieser W. Subclinical endometritis and its impact on reproductive performance in grazing dairy cattle in Argentina. Anim Reprod Sci. 2010; 122: 52-7.
79. Povia P, Teixeira-Pinto AM, Carneiro AH, Portuguese C-A. C-reactive protein, an early marker of community-acquired sepsis resolution: a multi-center prospective observational study. Crit Care. 2011; 15: R169.
80. Praderio RG, García Mitacek MC, Rearte R, Stornelli MC, Stornelli MA. Histomorphometrics studies in normal canine endometrium during dioestrus. XXI Congress of the European Veterinary Society for Small Animal Reproduction. Venecia, Italia. 22 y 23 de junio de 2018.
81. Pretzer SD. Canine embryonic and fetal development: a review. Theriogenology. 2008; 70: 300-03.
82. Ramos JLG, Ramos CLFG, Cunha ICN, Carvalho ECQ, Shimoda E, Luz MR. Análise histomorfométrica do útero na espécie canina do nascimento aos seis meses de idade. Arq Bras Med Vet Zootec. 2015; 67: 41-48.
83. Risco CA, Hernandez J. Comparison of ceftiofur hydrochloride and estradiol cypionate for metritis prevention and reproductive performance in dairy cows affected with retained fetal membranes. Theriogenology. 2003; 60: 47-58.
84. Rivera Cantero GA. Caracterización histopatológica del endometrio de yeguas con antecedentes clínicoreproductivos de subfertilidad. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Austral de Chile. 2003.
85. Rodrigues Monteiro CM, Venturoli Perri SH, Gameiro de Carvalho R, Burkhardt Koivisto M. Histologia e morfometria em cornos uterinos de cadelas nulíparas, múltiparas e tratadas com contraceptivos. Pesq Vet Bras. 2009; 29: 847-851.
86. Rondon MR, August PR, Bettermann AD, Brady SF, Grossman TH, Liles MR, Loiacono KA, Lynch BA, Mac-Neil IA, Minor C, Tiong CL, Gilman M, Osburne MS, Clardy J, Handelsman J, Goodman RM. Cloning the soil metagenome: A strategy for accessing the genetic and functional diversity of uncultured microorganisms. Appl Environ Microbiol. 2000; 66: 2541-2547.
87. Saavedra S, Díaz W, Faúndez R. Caracterización de los niveles plasmáticos de proteína C reactiva en perras sometidas a ovariectomía programada. Hospitales Veterinarios. 2009; 1: 15-22.
88. Salinas P, Miglino MA, del Sol M. Histomorphometrics and quantitative unbiased stereology in canine uteri treated with medroxyprogesterone acetate. Theriogenology. 2017; 95: 105-112.

89. Santos TM, Bicalho RC. Diversity and succession of bacterial communities in the uterine fluid of postpartum metritic, endometritic and healthy dairy cows. PLoS ONE. 2012; 7: e53048.
90. Santos TM, Gilbert RO, Bicalho RC. Metagenomic analysis of the uterine bacterial microbiota in healthy and metritic postpartum dairy cows. J Dairy Sci. 2011; 94: 291-302.
91. SAS®. (2003). SAS and STAT User's Guide, Release 9.1. SAS Institute Inc. Cary, NC, USA.
92. Schlafer DH. Diseases of the Canine Uterus. Reprod Dom Anim. 2012; 47: 318-322.
93. Senger PL. The Organization and Function of the Female Reproductive System. En *Pathways to pregnancy and parturition*. (pp.9-43). Second Revised Edition. 2003. Pullman, Washington: Current Conceptions, Inc. Washington State University.
94. Sertich PL. Intrauterine diagnostic procedures. En: Samper JC, Pycock JE, McKinnon AO, 2007. Current therapy in equine reproduction. Philadelphia, USA; Ed. Saunders Elsevier, pp. 36-43.
95. Sheldon IM, Lewis GS, LeBlanc S. Defining postpartum uterine disease in cattle. Theriogenology. 2006; 65: 1516-30
96. Sheldon IM, Price SB, Cronin J, Gilbert RO, Gadsby JE. Mechanisms of infertility associated with clinical and subclinical endometritis in high producing dairy cattle. Reprod Dom Anim. 2009; 44:1-9.
97. Sheldon IM, Rycroft AN, Dogan B, Craven M, Bromfield JJ, Chandler A, Roberts MH, Price SB, Gilbert RO, Simpson KW. Specific strains of *Escherichia coli* are pathogenic for the endometrium of cattle and cause pelvic inflammatory disease in cattle and mice. PLoS ONE. 2010; 5: e9192.
98. Shrotriya S, Walsh D, Bennani-Baiti N, Thomas S, Lorton C. C-Reactive Protein is an important biomarker for prognosis tumor recurrence and treatment response in adult solid tumors: A Systematic Review. PLoS One. 2015; 10: e0143080.
99. Sikora M, Król J, Nowak M, Stefaniak T, Aubertsson G, Kozdrowski R. The usefulness of uterine lavage and acute phase protein levels as a diagnostic tool for subclinical endometritis in Icelandic mares. Acta Vet Scand. 2016; 58:50.
100. Silva E, Leitão S, Tenreiro T, Pomba C, Nunes T, Lopes da Costa L, Mateus L. Genomic and phenotypic characterization of *Escherichia coli* isolates recovered from the uterus of puerperal dairy cows. J Dairy Sci. 2009; 92: 6000-10.
101. Silva-Molano RF, Loaiza-Echeverri AM. "Piómetra en animales pequeños". Vet Zootec. 2007; 1: 71-86.
102. Sisson, S.; Grossman, J.D. (1982). "Aparato urogenital de los carnívoros". En *Robert Getty Anatomía de los animales domésticos*. (pp.1728-1741). (5ta ed.). Barcelona: Salvat Editores, S.A.
103. Smith RP, Lipworth BJ. C-reactive protein in simple community-acquired pneumonia. Chest. 1995; 107: 1028-31.
104. Stadnyk AW, Gauldie J. The acute phase protein response during parasitic infection. Immunol Today. 1991; 12: 7-12.

105. Stornelli MA, Cerdá R, Arauz MS, Gobello MC, Stanchi NO. Estudio de Mycoplasmas y Bacterias Aeróbicas en la vagina craneal de hembras caninas clínicamente sanas. An Vet. 2000; 20: 40-42.
106. Stornelli MC, García Mitacek MC, Giménez F, Bonaura MC, Videla Dorna I, de la Sota RL, Stornelli MA. Pharmacokinetics of eCG and induction of fertile estrus in bitches using eCG followed by hCG. Theriogenology. 2012; 78: 1056-64.
107. Stornelli MC, Nuñez Favre R, Praderio RG, Gomez Castro MG, Stornelli MA. Serum progesterone level, volume and apoptosis of corpus luteum in early, medium and later diestrous in the bitch. XXI Congress of the European Veterinary Society for Small Animal Reproduction. Venecia, Italia. 22 y 23 de junio de 2018.
108. Verstegen J, Dhaliwal G, Verstegen-Onclin K. Mucometra, cystic endometrial hyperplasia, and pyometra in the bitch: advances in treatment and assessment of future reproductive success. Theriogenology. 2008; 70: 364-74.
109. Wagener K, Christoph G, Drillich M. A review of the ongoing discussion about definition, diagnosis and pathomechanism of subclinical endometritis in dairy cows. Theriogenology. 2017; 94: 21-30.
110. Watts JR, Wright PJ, Lee CS. Endometrial cytology of the normal bitch throughout the reproductive cycle. J Small Anim Pract. 1998; 39: 2-9.
111. Watts JR, Wright PJ, Whithear KC. Uterine, cervical and vaginal microflora of the normal bitch throughout the reproductive cycle. Journal of Small Animal Practice. 1996; 37: 54-60.
112. Watts JR, Wright PJ. Investigating uterine disease in the bitch: uterine cannulation for cytology, microbiology and hysteroscopy. J Small Anim Pract. 1995; 36: 201-6.
113. Wilborn RR, Maxwell HS. Clinical approaches to infertility in the bitch. Vet Clin Small Anim. 2012; 42: 457-68.
114. Wira C, Fahey J, Ghosh M, Patel MK, Hickey D, Ochiel D. Sex hormone regulation of innate immunity in the female reproductive tract: The Role of Epithelial Cells in Balancing Reproductive Potential with Protection Against Sexually Transmitted Pathogens. Am J Reprod Immunol. 2010; 63: 544-565.

## **BIOGRAFÍA**

La Médica Veterinaria Romina Gisele Praderio nació en la ciudad de La Plata el 20 de mayo de 1988. Realizó sus estudios de Educación Primaria en la Escuela Manuel Rocha Nro. 45 de la ciudad de La Plata y sus estudios de Educación Secundaria en la Escuela de Educación Media Nro. 34-Ex Escuela Normal Superior N°3-ALMAFUERTE de la ciudad de La Plata graduándose en el año 2005 con Diploma de Honor en mérito a su buen desempeño. Ingresó a la FCV-UNLP en Febrero de 2006 y obtuvo el título de Médica Veterinaria en diciembre de 2011. En el año 2008 fue concurrente de la Cátedra de Patología General de la FCV-UNLP. En el año 2009 fue concurrente en el Servicio Central de Cirugía y Cátedra de Medicina Operatoria (Cirugía I) de la FCV-UNLP. En el año 2010 fue concurrente en el Consultorio Externo e Internación de Pequeños Animales del Hospital Escuela de la FCV-UNLP. En el año 2011 ingresó como concurrente a la Cátedra y Laboratorio de Reproducción Animal de la FCV-UNLP, y desde diciembre de 2012 se desempeña como Ayudante Diplomado Ad-Honorem. Desde diciembre de 2012 y en la actualidad cumple función como Médica Interna del Servicio de Reproducción Animal de la FCV-UNLP. Desde mayo de 2015 y en la actualidad cumple función como Médica Interna del Servicio de Reproducción Animal del Hospital Escuela de la FCV-UNLP. En 2011-2013 fue Asistente en la Clínica veterinaria “Clínica del Sol” de la ciudad de La Plata.

En el año 2010 dio sus primeros pasos en la investigación, y en 2011 obtuvo por concurso una beca de investigación para estudiantes de la FCV-UNLP

de un año de duración. En Octubre de 2011 obtuvo por concurso una beca de Entrenamiento para alumnos universitarios de la Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires-CIC. Más tarde, en abril de 2013, obtuvo por concurso una beca de estudio Tipo A de la UNLP para iniciar sus estudios de Doctorado. Posteriormente, en junio de 2014 obtuvo por concurso una beca del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas-CONICET, para finalizar su trabajo de tesis doctoral.

Reconociendo la necesidad de especializarse, en el año 2010 comenzó a trabajar en el área de Reproducción de Pequeños Animales, área en la que desde entonces ha desarrollado tareas de docencia, investigación y extensión, dictando cursos y pasantías de postgrado, realizando capítulos de libros, publicando trabajos científicos y de divulgación técnica y asistiendo a Jornadas y Congresos científicos nacionales e internacionales.

En el año 2011, comenzó a desarrollar su actividad en investigación como colaboradora del Programa de Incentivos, y más tarde, en 2014, pasó a ser integrante del proyecto, desarrollando su actividad en investigación como Docente Investigadora del Programa de Incentivos. En 2013, comenzó a desarrollar su Tesis Doctoral en esta Facultad bajo la dirección de la Doctora María Alejandra Stornelli y la codirección de María Carla García Mitacek en el Laboratorio y Servicio de Reproducción Animal.

En 2014 obtuvo un Subsidio de viajes y estadías por parte de la UNLP para realizar una pasantía de dos meses sobre “Estudo dos perfis proteicos endometriais em cães normais e com endometrite” en el Laboratório de Proteômica, Departamento de Reprodução Animal, Faculdade de Medicina

Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista-UNESP, Campus Botucatu, San Pablo, Brasil.

Una vez finalizada esta tesis, a partir de Abril de 2019 continuará con su labor de docencia e investigación con una Beca Posdoctoral de CONICET sobre afecciones uterinas en pequeños animales en el Laboratorio y Servicio de Reproducción Animal en el Área de Pequeños Animales.